



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR**

**MELLINA MONTEIRO JACOB**

**PROPRIEDADES ESPACIAIS DAS RESPOSTAS ISOLADAS DE  
CONES L E M AO ELETORRETINOGRAMA: IMPLICAÇÕES  
SOBRE A ATIVIDADE DAS VIAS VISUAIS PARALELAS**

Belém - Pará

2015

**MELLINA MONTEIRO JACOB**

**PROPRIEDADES ESPACIAIS DAS RESPOSTAS ISOLADAS DE  
CONES L E M AO ELETORRETINOGRAMA: IMPLICAÇÕES  
SOBRE A ATIVIDADE DAS VIAS VISUAIS PARALELAS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Neurociências e Biologia Celular (Área de  
Concentração Neurociências), Instituto de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do  
Pará, como requisito parcial para a obtenção de  
título de doutor em Neurociências e Biologia  
Celular.**

**Orientador: Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes**

**Co-orientador: Prof. Dr. Givago da Silva Souza.**

Belém - Pará

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Jacob, Mellina Monteiro, 1985-

Propriedades espaciais das respostas isoladas de cones L e M ao eletrorretinograma: implicações sobre a atividade das vias visuais paralelas. / Mellina Monteiro Jacob. - 2015.

Orientador: Bruno Duarte Gomes;

Coorientador: Givago Da Silva Souza.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2015.

1. Eletrorretinografia. 2. Retina - Doenças - Diagnóstico. I. Título.

CDD 23. ed. 617.71547

---

MELLINA MONTEIRO JACOB

**PROPRIEDADES ESPACIAIS DAS RESPOSTAS ISOLADAS DE  
CONES L E M PARA O ELETORRETINOGRAMA: IMPLICAÇÕES  
SOBRE A ATIVIDADE DAS VIAS VISUAIS PARALELAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de Concentração Neurociências), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção de título de doutor em Neurociências e Biologia Celular.

**Professor Dr. Bruno Duarte Gomes (orientador)**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Professor Dr. Givago da Silva Souza (co-orientador)**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

**Professor Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva (membro titular)**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Professor Dr. Fernando Allan de Farias Rocha (membro titular)**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA – Membro Titular

**Professor Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira (membro titular)**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

**Professora Dr<sup>a</sup>. Eliza Maria da Costa Brito Lacerda (membro suplente)**

Faculdade de Castanhal, FCAT

Belém  
2015

JACOB, MELLINA MONTEIRO.

PROPRIEDADES ESPACIAIS DAS RESPOSTAS ISOLADAS DE CONES L E M PARA O ELETORRETINOGRAMA: IMPLICAÇÕES SOBRE A ATIVIDADE DAS VIAS VISUAIS PARALELAS

Belém, Pará, UFPA/ICB, 2015.

122f

Tese de Doutorado em Neurociências

1. Eletorretinograma. 2. Fotorreceptores. 3. Estímulo de isolamento de cones. 4. Retina periférica e central. 5. Mecanismos pós-receptorais. 6. Células ganglionares retinianas. 7. Vias visuais parvocelular e magnocelular. 8. Vias visuais de cor e luminância. 9. Sensibilidade ao contraste. 10. Processamento paralelo.

I.Universidade Federal do Pará / Instituto de Ciências Biológicas. II. Título.

Aos meus pais.

Ao Mauro.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Bruno Duarte Gomes, meu orientador. Muito obrigada por toda a confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos e pelo reconhecimento. Ao me aceitar como sua primeira aluna de mestrado e também doutorado, me permitiu iniciar e continuar no caminho da pesquisa científica. O seu apoio e incentivo foram muito importantes para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao meu co-orientador, professor Givago da Silva Souza, por agir sempre com ética e dedicação aos seus alunos e à ciência. Para mim é um exemplo de determinação, competência e solidariedade. Obrigada por todos os ensinamentos e por estar sempre disposto a me ajudar.

Ao professor Luiz Carlos de Lima Silveira, pelos ensinamentos preciosos e por todo o apoio para a minha formação. Para mim é uma honra poder fazer da sua equipe. A sua dedicação incansável à ciência é uma fonte de inspiração.

Ao professor Jan Kremers, a quem me faltam palavras para agradecer por toda a confiança e dedicação. O maior de todos os benefícios de ter passado um período de minha formação na Alemanha, foi o de ter tido a oportunidade de trabalhar e aprender com um profissional brilhante, dedicado, humilde e um ser humano incrível. Obrigada por ter me recebido tão bem em seu laboratório.

Aos membros do departamento de oftalmologia (Augenlinik) da Universidade Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, (Erlangen – Alemanha), que me acolheram e fizeram sentir-me em casa. Especialmente a Tina Tsai, Konstantinos Tsaousis, Bettina Hohberger e à “Frau” Edith Monczak, por toda a ajuda com meu projeto, pelas conversas e pelas muito úteis “aulas” de alemão. Vielen Dank!

Aos membros do Laboratório de neurologia tropical, que já ultrapassaram as barreiras de “colegas de trabalho” e que são verdadeiros amigos. Muito obrigada pela ajuda, pelas sugestões, discussões e momentos de descontração. Especialmente às amigas Eliza Lacerda, Carolina Araújo, Veronica Ribeiro, Letícia Miquilini, Isabelle Martins, Terezinha Loureiro, Joyce Freitas e ao amigo Raílson Salomão.

Aos pesquisadores: Gobinda Pangen, Manoel da Silva Filho, John Maguire, Neil Parry e Declan McKeefry, pela importante colaboração para a publicação deste trabalho.

Aos voluntários que participaram dos experimentos, pela paciência gigante e pela dedicação para concluir as mais de dez longas horas de teste. Ser voluntário de um teste eletrofisiológico nunca é fácil: é necessário perder o medo de colocar o eletródio no olho, suportar o desconforto da estimulação visual e vencer o sono que ela provoca. Vocês passaram por todas as etapas com louvor!

À minha amada família, meus pais e minha irmã, que são a base de tudo o que eu sou. Vocês sempre me incentivaram a ir mais adiante. Por verem em mim o potencial para

ultrapassar qualquer obstáculo, me deram coragem e me fizeram acreditar na minha capacidade para enfrentar qualquer desafio.

Ao Mauro, por estar sempre ao meu lado. Você não só me ajudou e incentivou a seguir meus sonhos e ideais, mas os tornou seus. Muito obrigada pelo amor, carinho, companheirismo e paciência, e por cruzar o oceano para me ajudar.

Ao CNPq e ao programa Ciência sem Fronteiras, pelo suporte financeiro.

Ao programa de pós-graduação em neurociências e biologia celular.

À universidade Federal do Pará.

Existem muitas outras pessoas que participaram de maneira indireta para a conclusão deste trabalho, a elas, o meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com cooperação entre duas instituições:

- Laboratório de neurologia Tropical, Núcleo de medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, sob a orientação do Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes e co-orientação do Prof. Dr. Givago da Silva Souza. Em vigência, suporte financeiro do CNPq#152823.
- Departamento de oftalmologia da instituição Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg em Erlangen, Alemanha, sob supervisão do professor doutor Jan Kremers. Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos durante período de doutorado sanduíche, entre 01 de março de 2013 e 28 de fevereiro de 2014. Suporte financeiro: programa Ciência Sem Fronteiras do Ministério da Educação do Brasil (CAPES, CNPQ-CSF#245794).

## RESUMO

Foi estudada a organização espacial dos sinais de cones L e M ao eletrorretinograma (ERG), refletindo a atividade das vias pós-receptorais magno e parvocelular. Para tal, foram criados estímulos senoidais que isolavam as respostas de cones L e M e que eram emitidos por um estimulador que utilizava quatro primárias de LED, permitindo que fosse aplicado o paradigma da tripla substituição silenciosa. As frequências temporais utilizadas foram de 8 e 12 Hz, para refletir a atividade de oponência de cones, e 30, 36 e 48 Hz para refletir a atividade de luminância. As respostas de eletrorretinograma foram registradas com estímulos que alcançavam todo o campo visual (campo total) e por estímulos que variavam em configuração espacial, entre estímulos circulares e anelares com diâmetros diferentes. Os resultados obtidos confirmam a presença de dois mecanismos de resposta diferentes a estímulos com frequências temporais intermediárias e altas. As respostas de ERG medidas em frequências temporais altas dependeram fortemente da configuração espacial de estimulação. Nas condições registradas com campo total (*Full-field electroretinogram*, FF), as respostas de cones L foram substancialmente maiores do que as respostas de cones M na mesma condição, e do que as respostas de cones L a estímulos menores. Já as respostas de cones M aos estímulos com campo total e com diâmetro de 70°, apresentaram valores de amplitude similares. As respostas de cones L e M medidos com frequências temporais de 8 e 12 Hz, apresentaram amplitudes similares, e estavam aproximadamente em contra-fase. As amplitudes foram constantes para a maioria das configurações de estimulação. Os resultados indicaram que, quando as respostas de ERG refletem a atividade de luminância, elas estão correlacionadas positivamente com o tamanho do estímulo. Além de 35° de excentricidade retiniana, a retina contém principalmente cones L. Estímulos pequenos são suficientes para obter respostas máximas de ERG em frequências temporais intermediárias, onde o ERG é sensível também ao processamento de oponência de cones.

**Palavras-chave:** Eletrorretinograma. Fotorreceptores. Estímulo de isolamento de cones. Retina periférica e central. Mecanismos pós-receptorais. Células ganglionares retinianas. Vias visuais parvocelular e magnocelular. Vias visuais de cor e luminância. Sensibilidade ao contraste. Processamento paralelo.

## ABSTRACT

We studied the spatial arrangement of L- and M-cone driven electroretinograms (ERGs) reflecting the activity of magno- and parvocellular pathways. L- and M-cone isolating sine wave stimuli were created with a four primary LED stimulator using triple silent substitution paradigms. Temporal frequencies were 8 and 12 Hz, to reflect cone opponent activity, and 30, 36 and 48 Hz to reflect luminance activity. The responses were measured for full-field stimuli and for different circular and annular stimuli. The ERG data confirm the presence of two different mechanisms at intermediate and high temporal frequencies. The responses measured at high temporal frequencies strongly depended upon spatial stimulus configuration. In the full-field conditions, the L-cone driven responses were substantially larger than the full-field M-cone driven responses and also than the L-cone driven responses with smaller stimuli. The M-cone driven responses at full-field and with 70° diameter stimuli displayed similar amplitudes. The L- and M-cone driven responses measured at 8 and 12 Hz were of similar amplitude and approximately in counter-phase. The amplitudes were constant for most stimulus configurations. The results indicate that, when the ERG reflects luminance activity, it is positively correlated with stimulus size. Beyond 35° retinal eccentricity, the retina mainly contains L-cones. Small stimuli are sufficient to obtain maximal ERGs at low temporal frequencies where the ERGs are also sensitive to cone-opponent processing.

**Key-words:** electroretinogram; Photoreceptors; cone-isolating stimulus; central and peripheral retina; post-receptoral mechanisms; retinal ganglion cells; magnocellular and parvocellular visual pathways; color and luminance visual pathways; contrast sensitivity; Parallel processing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática mostrando a organização celular da retina em camadas	20
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática mostrando as diferenças estruturais entre os fotorreceptores.	23
<b>Figura 3</b>	A opsina visual e o processo de fototransdução.	25
<b>Figura 4</b>	Curva de sensibilidade espectral de cones e bastonetes.	27
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática que mostra a comparação entre a transmissão de potencias entre os sistemas de cones e de bastonetes.	29
<b>Figura 6</b>	Imagem colorida artificialmente, mostrando o mosaico de cones L (vermelho), M (verde) e S (azul) em áreas diferentes da retina do mesmo sujeito.	30
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática da ativação das células bipolares ON e OFF	33
<b>Figura 8</b>	Visão vertical dos tipos diferentes de células bipolares da retina de primatas (Representação esquemática).	35
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática da morfologia dos três tipos de células ganglionares de primatas: células ganglionares P; células ganglionares M e células ganglionares K	38
<b>Figura 10</b>	Campos receptivos de células ganglionares M, os quais são formados por regiões centrais e periféricas aproximadamente concêntricas.	40
<b>Figura 11</b>	Tipos de campos receptores de células ganglionares P que apresentam propriedades de oponência de cor.	43
<b>Figura 12</b>	Tipos de eletrodos ativos utilizados no ERG.	46
<b>Figura 13</b>	Ilustração que mostra as formas de onda obtidas de acordo com o estímulo emitido no eletrorretinograma de campo total padronizado pela ISCEV	49
<b>Figura 14</b>	Ilustração que exemplifica o tipo de estimulação utilizado no método de substituição silenciosa.	54
<b>Figura 15</b>	Configuração de estimulação espacial de estímulos circulares (superiores), de campo total (FF) e anelares (inferiores) utilizados no eletrorretinograma.	65
<b>Figura 16</b>	Exemplo de placa de restrição visual demonstrando estímulo anelar	66

AN10°

- Figura 17** Estimulador *Ganzfeld* com placa de restrição de campo visual acoplada 67
- Figura 18** Posicionamento dos eletrodos 70
- Figura 19** Registros originais de eletrorretinograma obtidos com estímulos isolados de cones L (linhas contínuas vermelhas) e cones M (linhas tracejadas verdes), ambos com contraste de cones de 10%, medidos em um sujeito. 73
- Figura 20** Média dos valores de amplitude (gráficos da esquerda) obtidos com o ERG para os cones L (círculos vermelhos) e M (triângulos verdes) em função da configuração de estimulação, medidos em cinco frequências temporais diferentes (escala linear). 75
- Figura 21** Análise de regressão linear entre o logaritmo da amplitude e o logaritmo do diâmetro de configuração espacial de estimulação, para as respostas de cones L (círculos vermelhos) e M (triângulos verdes) medidos com cinco frequências temporais (8, 12, 30, 36 e 48 Hz). 78
- Figura 22** Média dos valores de fase (gráficos da esquerda) obtidos com o ERG para os cones L (círculos vermelhos) e M (triângulos verdes) em função da configuração de estimulação, medidos em cinco frequências temporais diferentes (escala linear). 80
- Figura 23** Comparação entre os valores de amplitude (escala linear) do ERG medido com fundo preto (triângulos pretos) e fundo branco (círculos brancos) em frequências temporais de 12 e 30Hz. 81
- Figura 24** Comparação entre os valores de fase (escala linear) do ERG medido com fundo preto (triângulos pretos) e fundo branco (círculos brancos) em frequências temporais de 12 e 30 Hz. 82
- Figura 25** Comparação entre os valores de amplitude (escala linear) do ERG medido com cromaticidade média branca (círculos brancos) e avermelhada (triângulos rosa), em frequências temporais de 12 e 36 Hz. 84
- Figura 26** Comparação entre os valores de fase (escala linear) do ERG medido com cromaticidade média branca (círculos brancos) e avermelhada (triângulos rosa), em frequências temporais de 12 e 36 Hz. 85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ERG</b>	Eletrorretinograma
<b>cGMP</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>Na<sup>+</sup></b>	Íon sódio
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>PDE</b>	Enzima fosfodiesterase
<b>Cone S</b>	Cone sensível a comprimentos de onda curtos
<b>Cone M</b>	Cone sensível a comprimentos de onda médios
<b>Cone L</b>	Cone sensível a comprimentos de onda longos
<b>CPE</b>	Camada plexiforme externa
<b>CNI:</b>	Camada nuclear interna.
<b>CPI</b>	Camada plexiforme interna.
<b>CCG:</b>	Camada de células ganglionares.
<b>DB1</b>	Célula bipolar difusa (tipo 1)
<b>DB2</b>	Célula bipolar difusa (tipo 2)
<b>DB3</b>	Célula bipolar difusa (tipo 3)
<b>DB4</b>	Célula bipolar difusa (tipo 4)
<b>DB5</b>	Célula bipolar difusa (tipo 5)
<b>DB6</b>	Célula bipolar difusa (tipo 6)
<b>FMB</b>	Célula bipolar midget (OFF)
<b>IMB</b>	Célula bipolar midget (ON)
<b>BB</b>	Célula bipolar de cone S
<b>RB</b>	Célula bipolar de bastonete
<b>NGL</b>	Núcleo geniculado lateral
<b>DTL</b>	Eletródio do tipo Dawson, Trick e Litzkow
<b>ISCEV</b>	The International Society for Clinical Electrophysiology of Vision
<b>PDA</b>	Ácido piperidinedicarboxílico
<b>APB</b>	2-Amino-4-phosphonobutyrate
<b>CRT</b>	Tubos de raios catódicos
<b>LED</b>	Diodo emissor de luz
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>CIE</b>	Comissão internacional de iluminação

<b>FFT</b>	Transformada rápida de Fourier
<b>SNR</b>	Razão sinal-ruído ( <i>Signal to noise ratio</i> )
<b>FF</b>	<i>Full-field</i> (campo total)
<b>HFP</b>	Heterochromatic Flicker Photometry (fotometria por flicker heterocromático)
$V_\lambda$	Função de eficiência luminosa
<b>ARVO</b>	The Association for research on vision and Ophtalmology
<b>JCR</b>	Journal citation report
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1. RETINA: ORGANIZAÇÃO CELULAR E FUNCIONAL .....	18
1.2. O ELETORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL: PRINCÍPIOS BÁSICOS.....	45
1.3. ELETORRETINOGRAMA COM ISOLAMENTO DE CONES: O MÉTODO DE SUBSTITUIÇÃO SILENCIOSA .....	52
1.4. O ELETORRETINOGRAMA NO ESTUDO DAS VIAS VISUAIS DE COR E LUMINÂNCIA.....	56
1.5. O ELETORRETINOGRAMA COMO MEDIDA PARA AVALIAR A DISTRIBUIÇÃO DE CONES L E M NA RETINA .....	57
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>59</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>60</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	60
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	60
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
4.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA .....	61
4.1.1 Aspectos Éticos .....	62
4.2. MÉTODOS .....	63
4.2.1. Aquisição dos dados.....	63
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>72</b>
5.1 EXPERIMENTO 1 .....	72
5.2 EXPERIMENTO 2 .....	80
5.3 EXPERIMENTO 3 .....	83
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
6.1 AS RESPOSTAS DE ELETORRETINOGRAMA SÃO MEDIADAS POR DOIS MECANISMOS PÓS-RECEPTORAIS SEPARADOS .....	86
6.2 DEPENDÊNCIA DAS RESPOSTAS DE ELETORRETINOGRAMA EM RELAÇÃO À CONFIGURAÇÃO ESPACIAL DE ESTIMULAÇÃO .....	87
6.3 INTERAÇÕES COMPLEXAS DE SINAIS EM FREQUÊNCIAS TEMPORAIS ALTAS.....	89
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....</b>	<b>92</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE 1 – FICHA DE ANAMNESE .....</b>	<b>102</b>

<b>APÊNDICE 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE</b> .....	<b>104</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>105</b>
<b>ANEXO 1: RESUMO DO TRABALHO “THE INFLUENCE OF STIMULUS SIZE ON L- AND M-CONE DRIVEN ELECTRORETINOGRAMS” PUBLICADO NOS ANAIS DO EVENTO “THE ASSOCIATION FOR RESEARCH ON VISION AND OPHTHALMOLOGY – ARVO 2014 – ANNUAL MEETING”</b> .....	<b>106</b>
<b>ANEXO 2: ARTIGO INTITULADO “THE SPATIAL PROPERTIES OF L- AND M-CONE INPUTS TO ELECTRORETINOGRAMS THAT REFLECT DIFFERENT TYPES OF POST-RECEPTORAL PROCESSING”, PUBLICADO NA REVISTA “PLOS ONE”</b> .....	<b>108</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O processamento de informações pelo sistema visual depende de interações dentro do conjunto de estruturas complexas que o compõe. No entanto, o funcionamento exato de todas estas estruturas ainda não é totalmente conhecido. O estudo do sistema visual engloba várias abordagens que estão inseridas quase sempre em uma metodologia multidisciplinar. Notadamente, na interação de campos da psicologia experimental e neurociência. É um campo muito extenso e bastante prolífico em resultados que são usados como modelos de funcionamento do sistema nervoso. Em especial, de como a informação sensorial é adquirida e usada para gerar comportamento. Entender as bases fisiológicas dos fenômenos visuais como discriminação de cores, localização e identificação de objetos é essencial a futuras abordagens básicas e aplicadas na neurociência e áreas biomédicas. A presente tese é sobre o estudo do sistema visual humano no seu início: a retina.

As primeiras estruturas responsivas do sistema visual a entrarem em contato com a luz proveniente do ambiente são os fotorreceptores. Os fotorreceptores podem ser de dois tipos: cones e bastonetes, os quais são sensíveis a radiações eletromagnéticas na faixa de 400 nm a 700 nm em níveis de baixa, média e alta intensidade luminosa. Essa captação de diferentes receptores é usada em níveis pós-receptorais para iniciar a computação que levará a percepção de cores (SOLOMON; LENNIE, 2007).

O funcionamento dos tipos de cones, assim como das estruturas pós-receptorais que interagem com eles, pode ser avaliado através de um teste eletrofisiológico chamado de eletrorretinograma (ERG). Este teste é utilizado com frequência na prática clínica e em pesquisas básicas, possuindo tipos diferentes de estimulação, como, por exemplo, o *flash*, *flicker*<sup>1</sup>, tabuleiro de xadrez, entre outros (HOLDER et al, 2010; MARMOR et al, 2009). Também pode haver variação na frequência temporal de apresentação do *flicker*, ou nas áreas da retina que são estimuladas. Além do registro da atividade elétrica da retina, a utilização de estímulos sofisticados permite selecionar o tipo de célula ou mecanismo fisiológico da retina que contribuirá com maior energia ao registro eletrorretinográfico. Um desses estímulos altamente seletivos são os estímulos isoladores da atividade de um único fotorreceptor (DONNER; RUSHTON, 1959; ESTEVEZ; SPEKREIJSE, 1974; 1982; ISHIHARA, 1906).

---

<sup>1</sup>O termo *flicker* será usado nesta tese com o sentido de variação temporal periódica de um estímulo. Uma tradução aproximada deste termo para a língua portuguesa seria “piscamento”, no entanto como esta tradução ou qualquer outra não está consagrada na literatura biomédica em língua portuguesa preferiu-se manter o verbete na língua inglesa.

Através deste tipo de estimulação, a variação temporal do estímulo só muda o estado de excitação de um dos fotorreceptores, enquanto os demais têm seu estado de excitação inalterado ou minimamente alterado. Por isso também se diz que estes tipos de estímulos são de substituição silenciosa (CHALLA et al, 2010; KREMERS, 2003; KREMERS et al, 1999; KREMERS et al, 2010; KREMERS; PANGENI, 2012).

No presente estudo, as respostas eletrorretinográficas isoladas de cones L e M são obtidas com estímulos que variam em frequência temporal. Tais respostas foram obtidas em diferentes regiões retinianas (centrais e periféricas), em conjunto ou separadamente. Com intuito de conduzir os leitores a uma melhor compreensão dos resultados desta tese, foi feita uma fundamentação teórica do funcionamento das células retinianas, para introduzir conceitos básicos de processamento visual e uma revisão das bases técnicas e fisiológicas do eletrorretinograma e da técnica de isolamento de cones. Por fim, foi escrito sobre como a eletrorretinografia de isolamento de cones tem contribuído para desvendar o funcionamento retiniano e direcionar o leitor às hipóteses que norteiam esta tese.

### 1.1. RETINA: ORGANIZAÇÃO CELULAR E FUNCIONAL

A retina é o primeiro local de processamento neural da imagem. É onde a luz do ambiente é captada, convertida em impulsos eletroquímicos e conduzida entre as suas células nervosas dispostas em camadas, para então ser transmitida para as porções mais centrais do sistema nervoso (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006; TOVÉE, 2008).

A retina humana, assim como a retina de vertebrados em geral, é organizada em camadas. Nestas camadas pode-se observar três tipos de neurônios excitatórios e dois tipos de interneurônios moduladores. Correspondem aos neurônios excitatórios os fotorreceptores, que convertem a informação luminosa em impulso neural; as células bipolares, que transmitem esses impulsos para as células ganglionares; e as próprias células ganglionares, as quais, através dos seus axônios formam o nervo óptico e conduzem estes impulsos para fora da retina. Dentre os interneurônios moduladores estão as células horizontais, que modificam a transferência de sinais entre os fotorreceptores e as células bipolares; e as células amácrinas, cuja ação se estabelece na sinapse entre células bipolares e ganglionares (DACEY, 2000).

Além das células citadas acima, também estão presentes na retina elementos como o epitélio pigmentado e células gliais, como as células macrogliais (células de Müller e

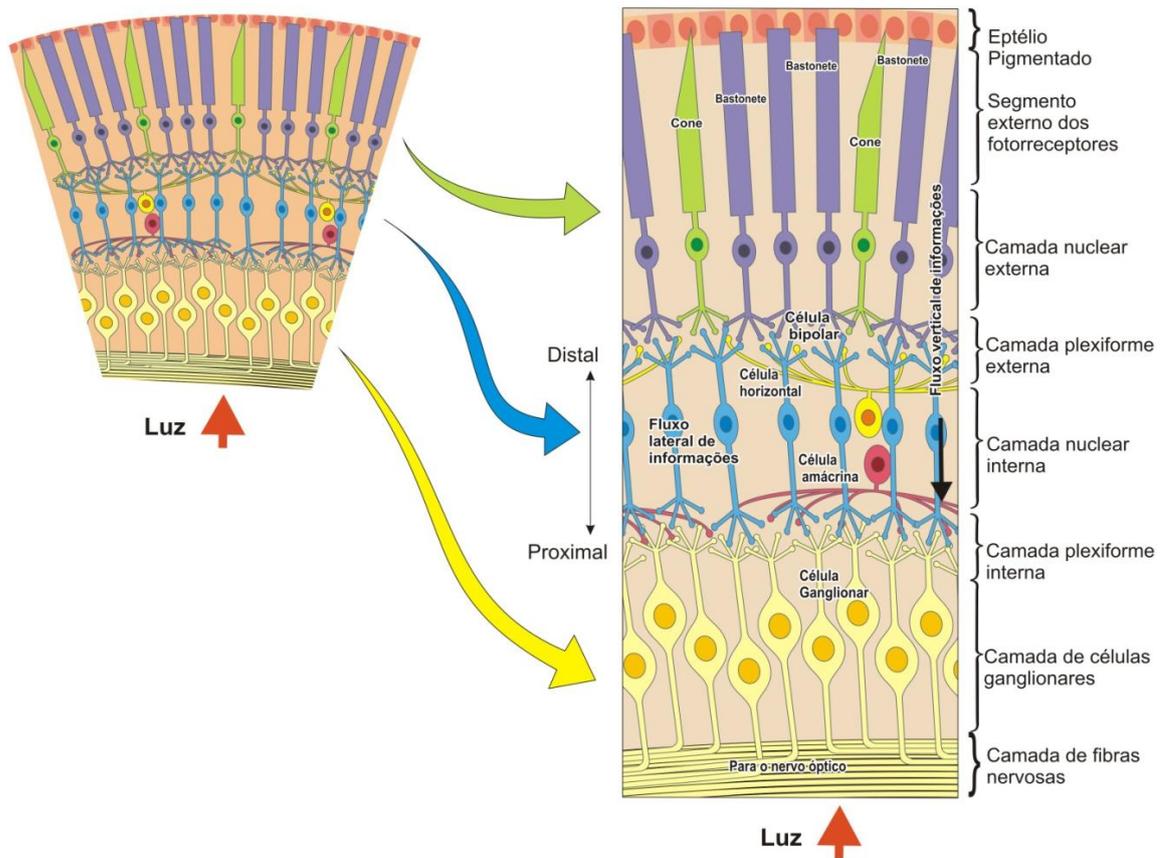
astrócitos) e micróglia, responsáveis pela homeostase retiniana (STRAUSS, 2005; REICHENBACH; BRINGMANN, 2013).

Dentre as células macrogliais presentes na retina de vertebrados, as mais importantes são as células de Müller e os astrócitos, as quais são indispensáveis para a sobrevivência neuronal, sendo responsáveis pelo suporte metabólico e homeostático da retina. Estas células mantêm o equilíbrio iônico, regulam o metabolismo neuronal, controlam a composição de fluido do espaço extracelular, fornecem suporte trófico e anti-oxidativo aos fotorreceptores e neurônios retinianos e controlam a espessura da barreira hemato-retiniana. As células de Müller também estão envolvidas na regulação da atividade sináptica da retina interna (RAMÍREZ et al, 1996; REICHENBACH; BRINGMANN, 2013).

No entanto, achados recentes revelaram outras funções das células de Müller. Por guiar a luz através do tecido da retina interna, estas células permitem uma razão sinal-ruído maior, minimizando o espalhamento de luz intra-retiniano e conservando a distribuição espacial dos padrões de luz na imagem propagada. Estas células também protegem os neurônios em casos de traumas mecânicos e também são o substrato necessário para o crescimento e plasticidade neuronal (REICHENBACH; BRINGMANN, 2013).

Já as células microgliais tem papel fundamental nos mecanismos de defesa da retina contra a invasão de microorganismos, assim como atuam na imunorregulação e reparação tecidual. Estas células participam da fagocitose de dendritos, facilitando os processos regenerativos. No caso de doenças auto-imunes, a micróglia inicia a uveoretinite e ao mesmo tempo limita a inflamação subsequente. Estas células também estão associadas a patologias como vitreoretinopatia, retinopatia diabética, glaucoma e degeneração macular relacionada à idade (CHEN; YANG; KIJLSTRA, 2002).

A distribuição das células retinianas ocorre nas seguintes camadas (Figura 1), vindo da porção posterior (externa) para a porção anterior (interna) do olho: na porção mais externa está localizada a **camada nuclear externa**, formada pelos fotorreceptores, cujos segmentos externos encontram-se imersos no epitélio pigmentado. Em seguida, encontra-se a **camada plexiforme externa**, na qual estão presentes as sinapses entre os fotorreceptores e as células bipolares e células horizontais. Na camada seguinte, chamada de **camada nuclear interna**, estão localizados os corpos celulares dos neurônios de segunda ordem: células bipolares, horizontais e amácrinas. As células bipolares e amácrinas fazem sinapse com as células ganglionares na **camada plexiforme interna**, chegando à camada mais interna da retina, a **camada de células ganglionares**, que contém os corpos celulares das células ganglionares (LEE; MARTIN; GRÜNERT, 2010).



**Figura 1.** Representação esquemática mostrando a organização celular da retina em camadas (Adaptado de Purves et al, 2004)

Antes da camada nuclear externa, encontra-se o epitélio pigmentado, que compreende uma única camada de células epiteliais hexagonais unidas entre si por junções estreitas e acondicionadas em uma matriz regular (STRAUSS, 2005). Os segmentos externos dos fotorreceptores, que correspondem à porção sensível à luz encontram-se imersos no epitélio pigmentado (LAMB; PUGH JR, 2004).

O epitélio pigmentado é responsável pela homeostase retiniana, já que nele ocorre a regeneração do fotopigmento, pela síntese da substância 11-cis retinal do fotopigmento. Pela disposição de suas células, este epitélio forma parte da barreira hemato-encefálica, protegendo a retina da circulação da coróide, além de desempenhar outras funções importantes. Dentre estas outras funções estão: a fagocitose das pontas envelhecidas dos segmentos externos dos fotorreceptores; transporte ativo de substâncias dos capilares da coróide para o interior dos fotorreceptores; absorção pelos grânulos de melanina dos fótons que passaram através ou entre os fotorreceptores; adesão da retina à coróide subjacente e manutenção do meio extracelular (LAMB; PUGH JR, 2004; STRAUSS, 2005; LAMB; PUGH JR, 2006).

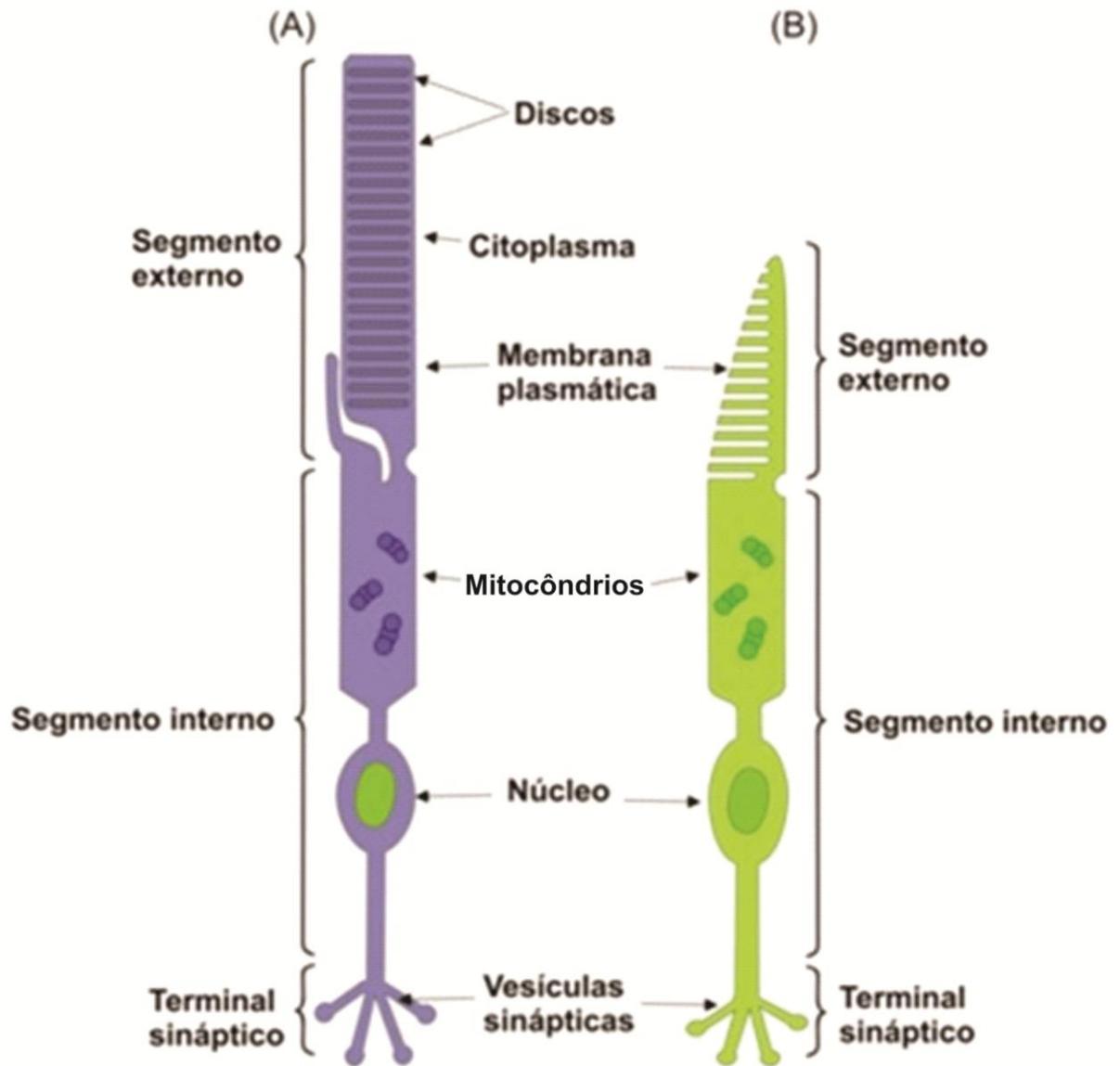
O processamento visual é iniciado quando os fótons que cruzam o sistema óptico do olho chegam à retina e são captados pelos fotorreceptores, células sensíveis à luz. Nestas células, a energia luminosa é convertida em impulso eletroquímico pelo processo de fototransdução (PUGH JR; LAMB, 2000). Ocorrem então, variações de potencial graduado nos fotorreceptores, resultando na hiperpolarização dos mesmos, com redução da liberação do neurotransmissor glutamato na fenda sináptica (LAMB; PUGH JR, 2006; PUGH JR; LAMB, 2000).

Os fotorreceptores são classificados em dois tipos: cones e bastonetes. Estas células possuem estruturas muito semelhantes, ambas são alongadas e polarizadas, divididas em segmento externo e segmento interno (Figura 2). O segmento interno é formado por organelas celulares e núcleo. O segmento interno conecta-se ao terminal sináptico, porção onde ocorre a sinapse entre o fotorreceptor e as células subsequentes (horizontais e bipolares). O segmento interno do fotorreceptor auxilia no direcionamento do feixe luminoso paralelamente ao eixo longitudinal do fotorreceptor, “guiando-o” em direção ao segmento externo, onde o fóton será capturado e ocorrerá o processo de fototransdução (GUYTON; HALL, 2011; PUGH JR; LAMB, 2000).

O segmento externo é composto pelas estruturas responsáveis pela fototransdução, os discos membranosos. Estas estruturas estão dispostas de maneira uniforme ao longo do segmento externo. A sensibilidade à luz dos discos membranosos deve-se ao fotopigmento presente em suas membranas, uma proteína receptora conhecida como opsina, a qual está

ligada a um cromóforo derivado da vitamina A, chamado 11-*cis*-retinal (CURCIO et al, 1987; PUGH JR; LAMB, 2000).

Os segmentos externos de cones e bastonetes diferem entre si na forma e na disposição do fotorreceptor, assim como nos tipos de pigmento e na regulação de reações intracelulares, produzindo também diferenças funcionais entre esses dois tipos de fotorreceptores (CURCIO et al, 1987; PUGH JR; LAMB, 2000).



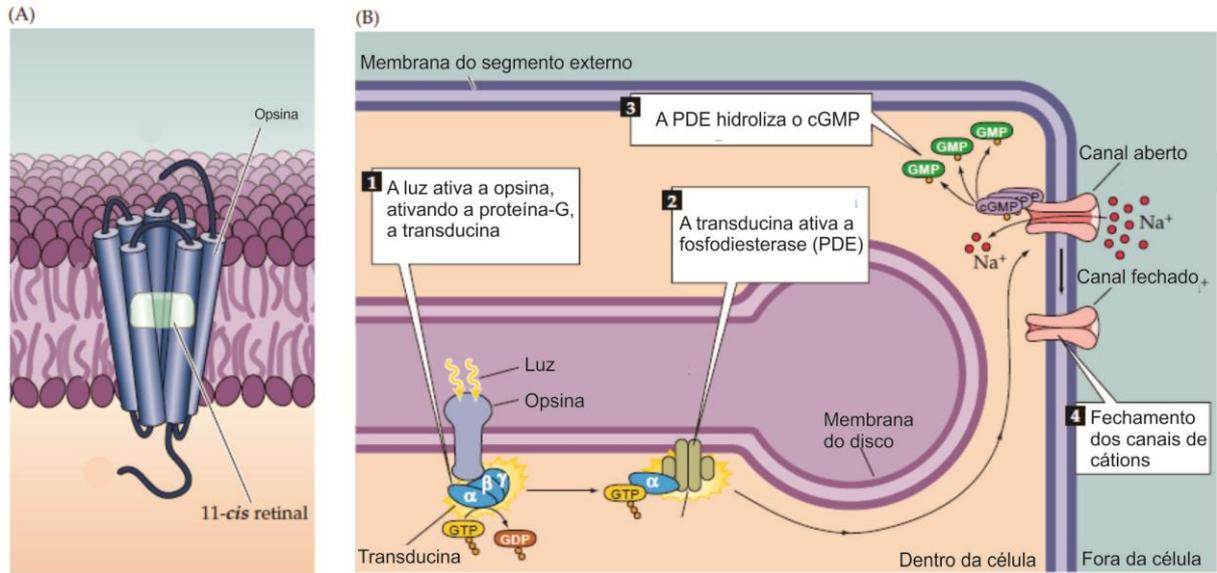
**Figura 2.** Representação esquemática mostrando as diferenças estruturais entre os fotorreceptores. (A) Estrutura do bastonete. (B) Estrutura do cone (Adaptado de Purves et al, 2004).

Apesar de suas diferenças estruturais e funcionais, os fotorreceptores desempenham mecanismos semelhantes de conversão da informação luminosa em alterações de seus potenciais de membrana, ou seja, em sinais neurais. Essa cascata de reações bioquímicas intracelulares ativadas pela incidência de luz é conhecida como fototransdução (LAMB; PUGH JR, 2006; YAU, 1994).

No entanto, para entender a fototransdução, é necessário entender o comportamento dos fotorreceptores quando estes se encontram em repouso, ou seja, quando não estão sendo estimulados pela luz. Na ausência de luz, há uma alta concentração citoplasmática de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), um segundo mensageiro intracelular produzido pela enzima guanilato ciclase. O cGMP mantém canais de cátions ( $\text{Na}^+$ ) abertos e, conseqüentemente, o influxo constante deste íon para o interior do fotorreceptor. Paralelamente a isso, há também a presença de canais vazantes que permitem uma corrente constante de íons potássio ( $\text{K}^+$ ) para o exterior da célula fotorreceptora (YAU, 1994). A este conjunto de correntes iônicas contínuas de sódio e potássio através da membrana plasmática dos fotorreceptores na ausência de luz, é chamado de “corrente do escuro”. A corrente de escuro mantém o fotorreceptor em um estado de despolarização, com liberação contínua do neurotransmissor glutamato (LAMB; PUGH JR, 2006; PUGH JR; LAMB, 2000).

Portanto, com a incidência de luz, a radiação eletromagnética é absorvida pelo 11-*cis*-retinal presente na opsina. Haverá então uma alteração na conformação do 11-*cis*-retinal em diferentes intermediários moleculares até se estabilizar na forma *all-trans*-retinal, ativando a opsina (BAYLOR; LAMB; YAU, 1979; BURNS et al, 2002; LAMB; PUGH JR, 2006; LAVAIL, 1976).

A ativação da opsina estimula então, a transducina, uma proteína G localizada na membrana plasmática do fotorreceptor. A sub-unidade alfa da transducina se separa das sub-unidades gama e beta e ativa a enzima fosfodiesterase (PDE). A PDE é uma enzima efetora que hidrolisa o cGMP, reduzindo a concentração intracelular do segundo mensageiro. A diminuição da concentração intracelular do cGMP implicará no fechamento dos canais iônicos de cátions e a interrupção da entrada de íons  $\text{Na}^+$ . Com o fechamento dos canais de cátions sensíveis a cGMP, resta apenas a corrente de saída de  $\text{K}^+$ , a qual hiperpolariza a membrana do fotorreceptor. A representação esquemática simplificada do processo de fototransdução pode ser observada na figura 3 (BURNS et al, 2002; LAMB; PUGH JR, 2006; TORRE; MATTHEWS; LAMB, 1986).



**Figura 3.** A opsina visual e o processo de fototransdução. (A) Ilustração simplificada da opsina visual e do cromóforo 11-*cis*-retinal. (B) Representação esquemática simplificada do processo de fototransdução: **1** – luz ativa a opsina, a qual ativa a transducina. **2** – Ativação da PDE pela transducina. **3** – PDE hidroliza o cGMP, reduzindo a sua concentração. **4** – A redução na concentração de cGMP provoca o fechamento dos canais de cátions (Adaptado de Purves et al, 2004).

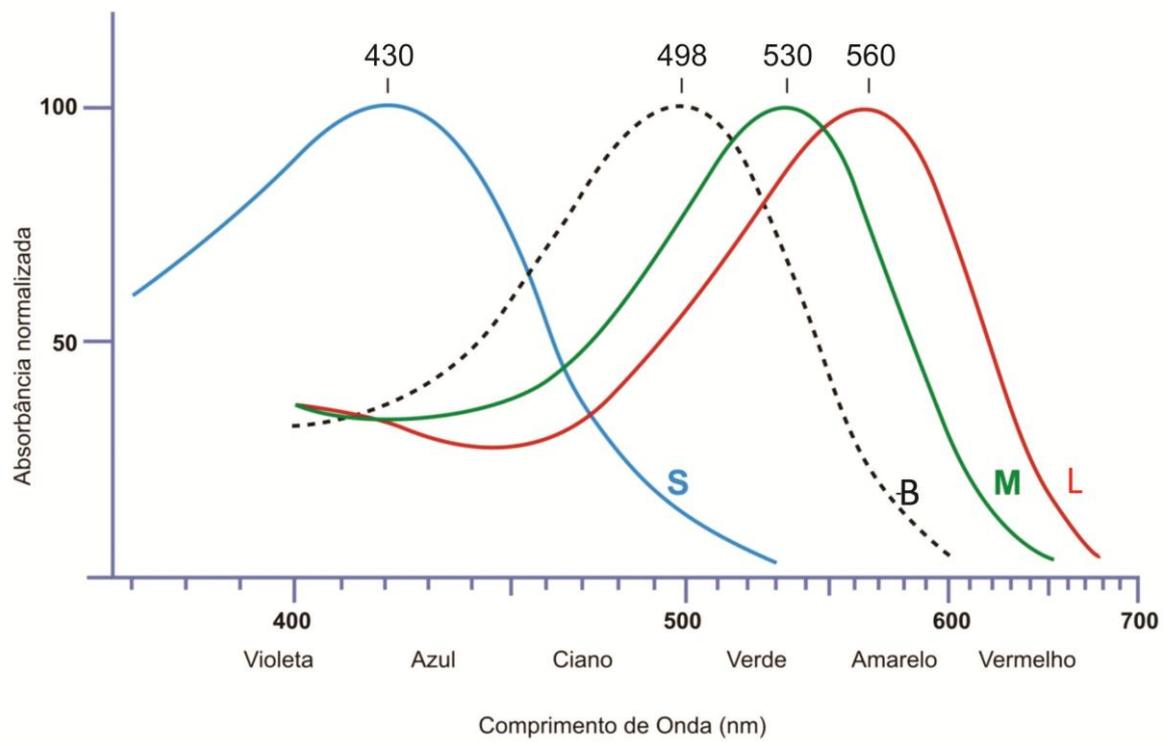
O segmento externo de bastonetes é alongado, possuindo uma quantidade maior de discos membranosos em seu interior (Figura 2), o que resulta em uma quantidade maior de fotopigmento. Os bastonetes podem responder à luz mesmo em níveis de intensidade luminosa muito baixos, o que não acontece com os cones. A provável explicação para isso é que a cascata bioquímica fototransdutora dos bastonetes é mais sensível que aquela presente nos cones (YAU, 1994). Por esta razão, os bastonetes são as células responsáveis pela visão escotópica ou noturna.

Já o segmento externo de cones é mais curto e estreito, com menor quantidade de discos membranosos e conseqüentemente, com menor concentração de fotopigmento (PUGH JR; LAMB, 2000). São necessários níveis luminosos mais altos para provocar a excitação de cones, os quais são ativados principalmente durante o dia, sendo responsáveis pela visão fotópica ou diurna. Além disso, ao contrário dos bastonetes, os cones possuem tipos diferentes de opsina visual, com diferentes funções de sensibilidade espectral. A informação da absorção de fótons dos cones será a base para computações diferenciais de neurônios pós-receptorais que finalizarão na percepção de cores, enquanto as informações advindas tanto de cones e bastonetes formam a base para computações pós-receptorais que levarão a percepção de contrastes de luminância (JOHNSON; WILLIAMS; REESE, 2001; SANES; ZIPURSKY, 2010).

Portanto, cones com sensibilidades espectrais diferentes podem ser classificados em três tipos: cones S (*short wavelength sensitive*), com pico de sensibilidade em comprimentos de onda curtos e absorção máxima em 430 nm (em torno da faixa azul do espectro electromagnético); cones M (*middle wavelength sensitive*), com sensibilidade a comprimentos de onda médios e pico de absorção em 530nm (em torno da faixa verde-amarelada do espectro eletromagnético) e cones L (*long wavelength sensitive*), com sensibilidade maior a comprimentos de onda longos, absorção máxima em 560 nm (em torno da faixa laranja do espectro electromagnético) (NATHANS; THOMAS; ROGNESS; 1986; NATHANS, 1999).

Assim, a sensibilidade espectral de um fotorreceptor é melhor entendida como uma medida da probabilidade de absorção de fótons com determinados comprimentos de onda, já que o sinal da resposta dos fotorreceptores será a mesma, independente do comprimento de onda do estímulo luminoso, sempre será uma resposta hiperpolarizante (Princípio da univariância) (ESTÉVEZ; SPEKHEIJSE, 1982; RUSHTON, 1972; SOLOMON; LENNIE, 2007).

Na figura 4, pode-se observar as curvas de sensibilidade espectral dos três tipos de cones e de bastonetes.



**Figura 4.** Curva de sensibilidade espectral de cones e bastonetes. **S:** cones S. **B:** bastonetes. **M:** cones M. **L:** cones L. (Adaptado de Solomon e Lennie, 2007)

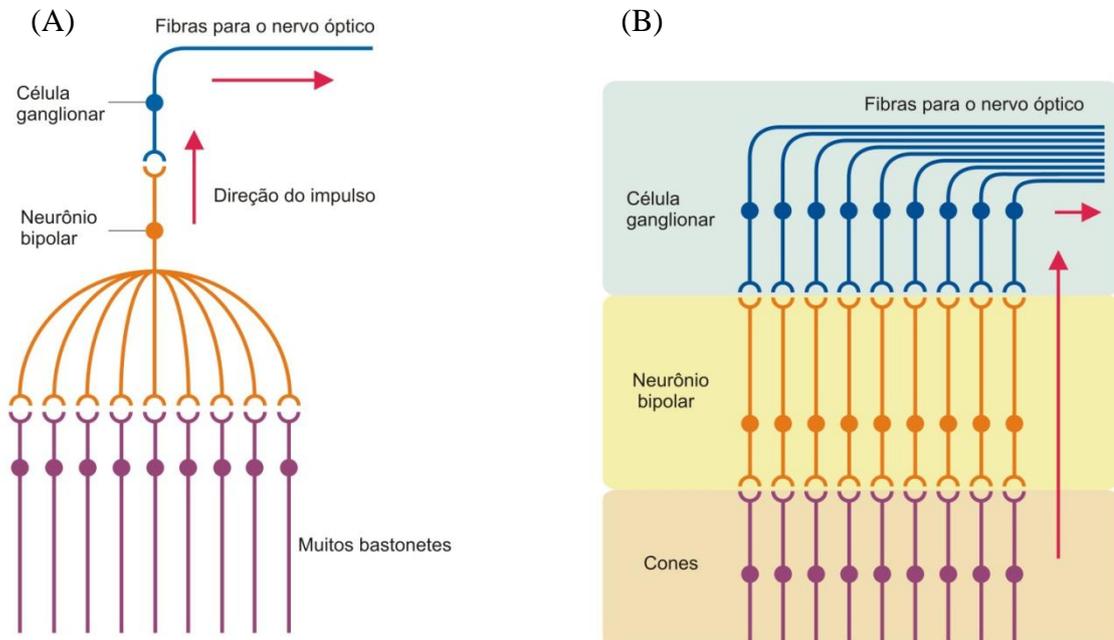
A distribuição de cones e bastonetes ao longo da retina também pode influenciar as características de discriminação visual de cada tipo de fotorreceptor. Em primatas do velho mundo, incluindo o ser humano, há unicamente fotorreceptores cones do tipo L e M no centro da retina. Com o alcance a excentricidades maiores, há uma redução brusca da densidade de fotorreceptores cones na periferia da retina e um aumento contínuo da densidade de fotorreceptores bastonetes até atingir o pico de densidade celular em torno de  $10^\circ$  de excentricidade retiniana. Há uma convergência dos sinais de vários bastonetes para uma célula ganglionar, caracterizando esta via de informação como uma via de baixa resolução espacial (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000) (FIGURA 5).

Como já escrito antes, os cones estão distribuídos nas porções centrais e periféricas da retina. A retina central possui uma área formada exclusivamente por cones, chamada fóvea, que é a região com melhor acuidade visual da retina, com discriminação ótima de formas e detalhes finos. A fóvea é altamente especializada devido a conexão dos cones com as células bipolares e destas com as células ganglionares ocorrer através de um sistema de linhas exclusivas (Figura 5). Neste sistema, as informações são transmitidas diretamente de um cone para uma célula bipolar e desta para uma célula ganglionar, em uma proporção de 1:1:1 (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

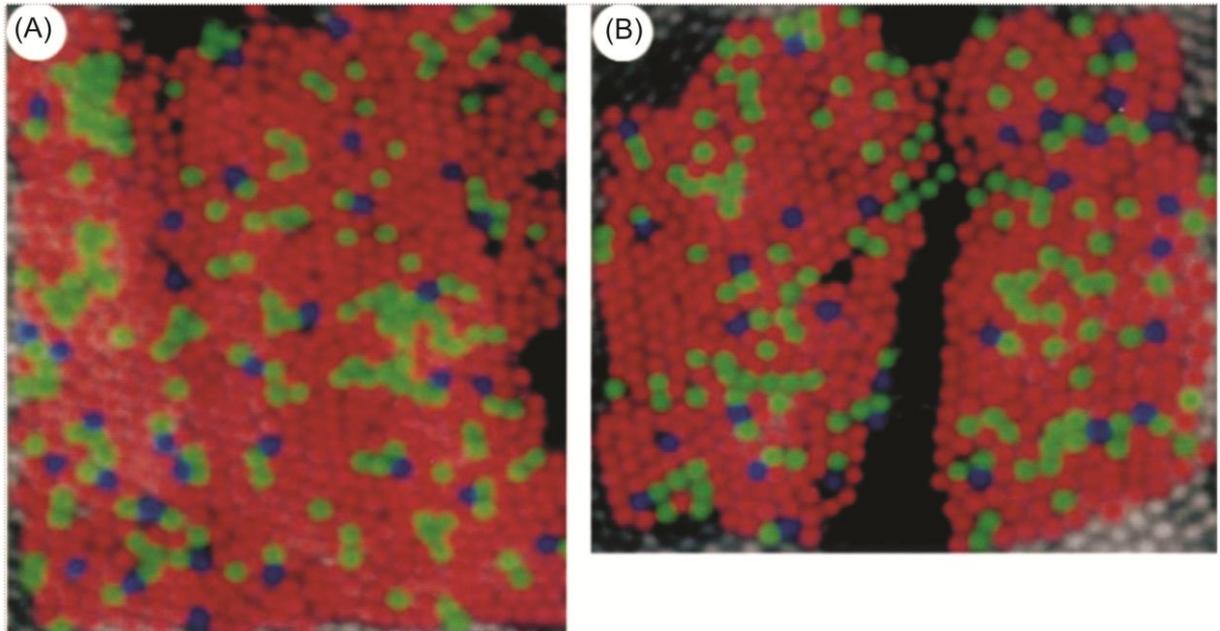
Há uma grande variação interindividual na distribuição de cones L e M pela retina, a qual apresenta característica aparentemente aleatória (ROORDA; WILLIAMS, 1999). A razão entre cones L e M pode variar de 0,4 a mais de 10. Apesar dessa variação no mosaico de cones, a visão de cores não será afetada. Em alguns estudos, o comprimento de onda percebido por alguns indivíduos como um “único amarelo”, não depende da proporção de cones L no mosaico (CARROLL; NEITZ; NEITZ, 2002; KREMERS et al, 2000; NEITZ et al, 2002; SOLOMON; LENNIE, 2007).

No que diz respeito aos cones S, não há grande variação em sua densidade, representando entre 5 a 10% dos cones presentes na retina. Hofer e colaboradores (2005), usando uma combinação entre técnicas de óptica adaptativa de alta resolução e densitometria retiniana, revelaram que as densidades de cones S, eram praticamente idênticas em todos os sujeitos participantes da pesquisa. Além disso, a distribuição deste tipo de cone na retina é praticamente regular (HOFER et al, 2005).

A Figura 6 mostra o arranjo espacial de diferentes tipos de cone na retina humana.



**Figura 5.** Representação esquemática que mostra a comparação entre a transmissão de potenciais entre os sistemas de cones e de bastonetes. (A): Sistema convergente de transmissão da informação dos bastonetes. (B): Sistema de linhas exclusivas de transmissão da informação dos cones (Adaptado de <http://nayanb.wikispaces.com/1.2+-+The+Biochemistry+of+Transformations+in+the+Retina>).



**Figura 6.** Imagem colorida artificialmente, mostrando o mosaico de cones L (vermelho), M (verde) e S (azul) em áreas diferentes da retina do mesmo sujeito. (A) Retina temporal, com 1° de excentricidade. (B) Retina nasal, com 1° de excentricidade. (Adaptado de Roorda e Williams, 1999).

A próxima etapa dos sinais neurais gerados nos fotorreceptores são as células bipolares. As alterações de potencial graduado nos fotorreceptores provocam alterações de potencial graduado nas células bipolares, as quais transmitem essas informações para as células amácrinas e ganglionares (DACEY, 1999).

Estas células respondem de maneira diferente ao neurotransmissor. Na presença de luz, os fotorreceptores hiperpolarizam e diminuem a liberação do neurotransmissor glutamato na fenda sináptica. As células pós-sinápticas em relação aos fotorreceptores são as células bipolares. Essas células apresentam diferentes padrões de resposta para a diminuição do glutamato liberado pelo fotorreceptor na presença de luz. Há um tipo de célula bipolar que tem o potencial de membrana despolarizado na presença de luz e diminuição de glutamato da sinapse com os fotorreceptores. Essas células são chamadas de células bipolares tipo ON. Há outro tipo de células bipolares que seguem a resposta hiperpolarizante dos fotorreceptores na presença de luz e são chamadas de células bipolares do tipo OFF. Na ausência de luz, estas células invertem seus sinais de respostas (BERNTSON; TAYLOR, 2000; MASSEY; MILLER, 1988; SLAUGHTER; MILLER, 1983).

A resposta dicotômica dessas duas classes de células bipolares deve-se aos receptores de glutamato presentes nestas células. As células bipolares OFF expressam receptores ionotrópicos do tipo AMPA/kainato que permitem a entrada de cátions na célula, enquanto as células bipolares ON expressam receptores metabotrópicos (mGluRs). Durante a diminuição de glutamato na fenda sináptica induzida pela presença de luz, há diminuição da ativação de ambos os receptores das células bipolares. No caso das células bipolares OFF, há diminuição da probabilidade de abertura dos receptores ionotrópicos e consequente hiperpolarização da célula. No caso das células bipolares ON, há diminuição da ativação do receptor metabotrópico e diminuição da cascata bioquímica sequencial à ativação deste receptor. O produto final da diminuição desta sinalização intracelular é a abertura de canais de cátions não seletivos do tipo TRPM1. No escuro estes canais TRPM1 são mantidos fechados. Com a abertura deste canal há entrada de cátions na célula e despolarização da membrana celular (DHINGRA; VARDI, 2012; TOVÉE, 2008).

Essa característica das células bipolares transforma um mesmo sinal que é transmitido dos fotorreceptores às células ganglionares em dois sinais de polaridade oposta através das vias chamadas de via ON e via OFF (BERNTSON; TAYLOR, 2000; HECKENLIVELY; ARDEN, 2006).

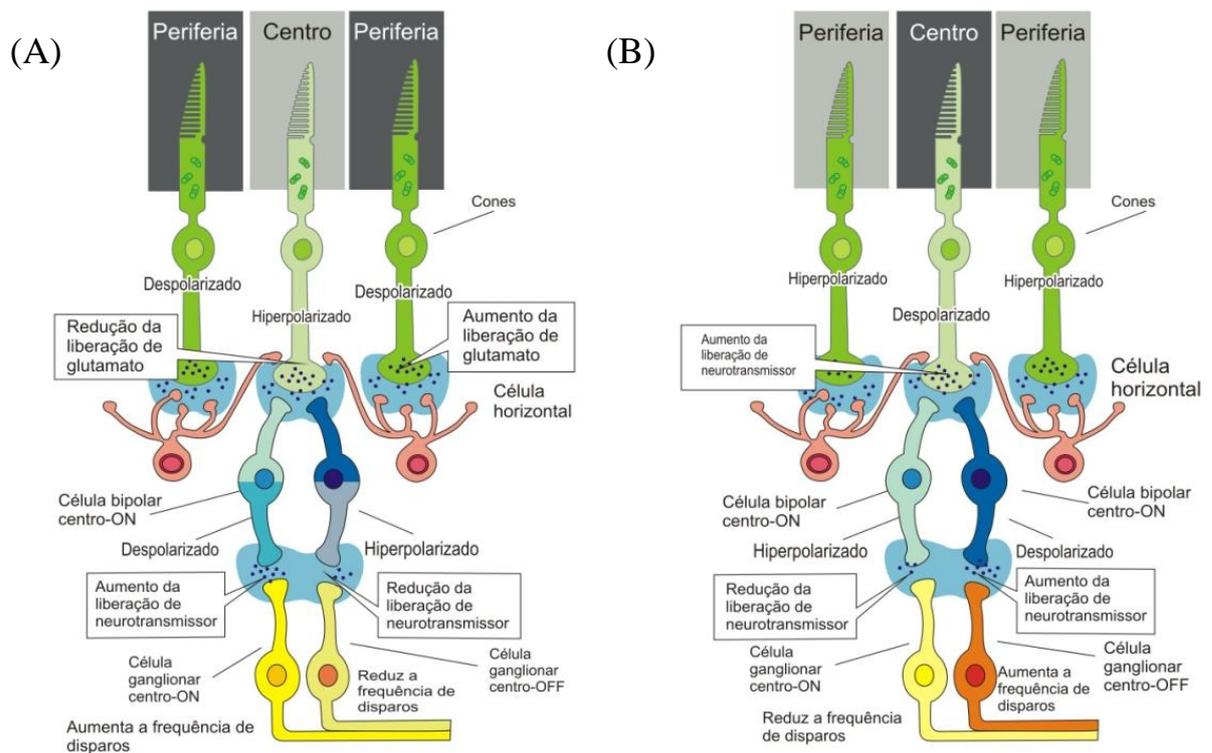
Os campos receptivos de células bipolares são divididos em centro e periferia (DACEY et al, 2000). O centro recebe aferências diretas dos fotorreceptores que fazem

sinapse com as células bipolares, enquanto a periferia recebe aferências dos fotorreceptores adjacentes, através de sinapses com as células horizontais. As células horizontais são interneurônios responsáveis pela transmissão lateral dos potenciais gerados nos fotorreceptores, ajustando, e assim otimizando, a transmissão de sinais entre fotorreceptores e células bipolares (BOYCOTT; WÄSSLE, 1974; SANES; ZIPURSKY, 2010).

Na retina da maioria dos primatas, existem três tipos de células horizontais (H1, H2 e H3), as quais correspondem a menos de 5% das células presentes na camada nuclear interna. As células horizontais H1 recebem sinais de fotorreceptores bastonetes e preferencialmente de fotorreceptores cones M e cones L, com poucas sinapses com cones S. Enquanto as células horizontais H2 recebem sinais vindos dos vários tipos de fotorreceptores cones. Já as células H3 realizam sinapse exclusivamente com cones L e M. (DOS REIS et al, 2002; DOS SANTOS et al, 2005; LEE et al, 1999; LEE; MARTIN; GRUNERT, 2010).

Há então, uma relação de oponência entre o centro e a periferia dos campos receptivos de células bipolares. As células bipolares do tipo ON, possuem o centro do campo receptivo do tipo ON (ativados com a presença de luz) e a periferia do tipo OFF (desativados com a presença de luz), enquanto as células bipolares OFF possuem centro OFF e periferia ON (BERNTSON; TAYLOR, 2000; MASSEY; MILLER, 1988).

Portanto, na presença de estimulação luminosa, os fotorreceptores hiperpolarizam, reduzindo a liberação de neurotransmissor e despolarizando assim, o centro dos campos receptivos das células bipolares do tipo ON. Simultaneamente, as células horizontais ligadas aos fotorreceptores da periferia não iluminada do campo receptivo sofrem despolarização, provocando a hiperpolarização da periferia OFF (Figura 7) (BERNTSON; TAYLOR, 2000).



**Figura 7.** Representação esquemática da ativação das células bipolares ON e OFF (A): Ativação de uma célula bipolar centro ON e periferia OFF. (B): ativação de uma célula bipolar centro OFF e periferia ON (Adaptado de <http://dstrong.blog.uvm.edu/neuroblog/center-surround.jpg>).

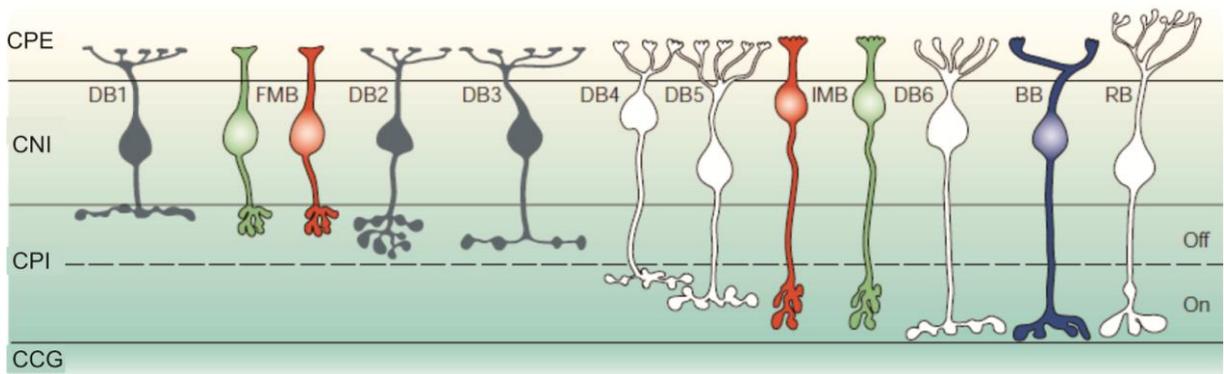
Na retina, existem aproximadamente 11 tipos morfológicamente distintos de células bipolares, as quais estão divididas em grupos, baseado no número e na distribuição de suas sinapses (MASLAND, 2001). Estes grupos podem ser divididos basicamente em células bipolares ON conectadas exclusivamente a bastonetes (célula bipolar de bastonetes) e células bipolares ON e OFF conectadas exclusivamente a cones, as quais emitem “ramos” para diferentes níveis da camada plexiforme interna, que contém processos de tipos diferentes de células amácrinas e ganglionares. Assim ramos de células bipolares OFF acomodam-se na sublâmina mais externa da camada plexiforme interna, enquanto os ramos de células bipolares ON são emitidos para a sublâmina mais interna (Figura 8) (MASLAND, 2001).

Entre os vários tipos de células bipolares de cones, destacam-se as células bipolares do tipo *midget*, as células bipolares difusas, e as células bipolares do cone S (Figura 8). Cada um desses tipos de células bipolares pertence a vias pós-receptorais diferentes (DACEY, 1999; DACEY et al, 2000; MASLAND, 2001).

As células bipolares do tipo *midget* ou anãs estabelecem conexões seletivas com os cones-L ou cones-M. Uma única célula bipolar *midget* recebe conexões de um único cone. Então, essa “linha exclusiva” de conexão tem o potencial de fornecer um tipo específico de entrada dos sinais de cones no centro do campo receptivo de uma célula ganglionar do tipo *midget* ou P (DACEY, 1999; DACEY et al, 2000; MASLAND, 2001). As células bipolares *midget* podem ser do tipo ON e OFF.

As células bipolares difusas são divididas em seis subgrupos distintos, de acordo com os níveis de estratificação de seus axônios na camada plexiforme interna. Estas células estão em contato com um grande número de cones (principalmente L e M), de maneira não seletiva, ou seja, elas recebem informações aditivas de cones L e M, tanto para o centro, quanto para a periferia de seus campos receptivos, concordando com o padrão de conexão de cones com estas células, determinado anatomicamente (DACEY, 1999; DACEY et al, 2000; MASLAND, 2001).

Já as células bipolares de cone S mantêm sinapses exclusivamente com cones S, recebendo apenas sinais do tipo ON no centro do seu campo receptivo, enquanto a periferia recebe sinais inibitórios (L+M)-OFF (HERR et al, 2003; LEE; MARTIN; GRÜNER, 2010; MASLAND, 2001).



**Figura 8.** Visão vertical dos tipos diferentes de células bipolares da retina de primatas (Representação esquemática). Os axônios das células bipolares terminam em camadas diferentes da retina. **CPE:** camada plexiforme externa. **CNI:** camada nuclear interna. **CPI:** camada plexiforme interna. **CCG:** camada de células ganglionares. Os axônios que terminam na metade externa da camada plexiforme interna são do tipo OFF, enquanto os que terminam na metade interna são do tipo ON. Os tipos de células bipolares representados são: células bipolares difusas OFF (**DB1, DB2 E DB3**) e ON (**DB4, DB5 E DB6**); células bipolares *midget* OFF (**FMB**) e *midget* ON (**IMB**); célula bipolar de cone S (**BB**) e célula bipolar de bastonete (**RB**) (Adaptado de Wässle, 2004)

As células bipolares fazem sinapse na camada plexiforme interna com células ganglionares e amácrinas. Os impulsos de células bipolares são então transmitidos diretamente para as células ganglionares ou através de conexões com as células amácrinas. As células amácrinas são interneurônios envolvidos em inúmeras subcircuitarias na retina interna. A função de apenas alguns dos 29 tipos de células amácrinas é conhecida (WÄSSLE, 2004). A célula amácrina AII (mais frequente), transmite o sinal proveniente das células bipolares de bastonetes para a retina interna através de junções comunicantes com as células bipolares ON de cones, e através de sinapses com inversão de sinal com as células bipolares OFF de cones, participando da formação e controle das respostas de células ganglionares (MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004).

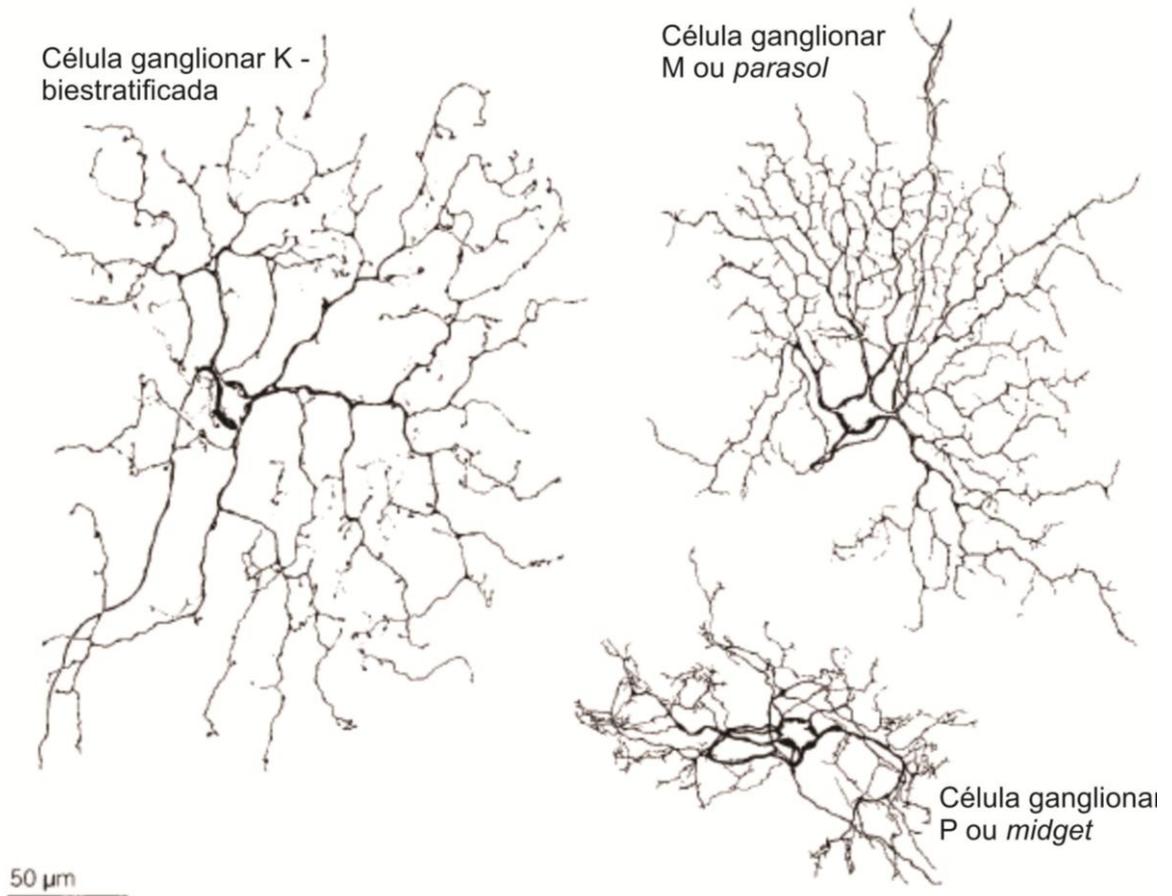
A segunda mais numerosa é a célula amácrina do tipo *Starburst*. Esta célula possui um papel importante na retina em desenvolvimento e na retina adulta. Através de sinapses colinérgicas e gabaérgicas estas células garantem a geração e a propagação de ondas dentro da retina em desenvolvimento, as quais são fundamentais para a formação e estabilização das sinapses ao nível das células ganglionares. Já na retina adulta estas células são responsáveis por mediar a direção seletiva dos impulsos nervosos dentro das células ganglionares, as quais são inibidas de uma maneira altamente seletiva (JOSELEVITCH, 2008; MASLAND, 2001). Outro tipo de células amácrinas são as dopaminérgicas, que ajustam a responsividade da retina à estímulos com brilhos de maior ou menor intensidades (MASLAND, 2001)

Então, os sinais de células bipolares são transmitidos às células ganglionares, que compõe a última camada da retina. Na literatura, foram descritos aproximadamente de 13 a 17 tipos diferentes de células ganglionares presentes na retina de mamíferos. Isso indica que os sinais de fotorreceptores divergem ainda mais na camada plexiforme interna, onde as células ganglionares, assim como as células bipolares, possuem padrões de contato multilaminares (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006; JOSELEVITCH, 2008; DACEY; PACKER, 2003).

Os campos receptivos das células ganglionares possuem centro e periferia com a mesma organização ON-OFF encontrada nas células bipolares. Com isso, pela organização de seus campos receptivos, as células ganglionares podem ser classificadas em tipos ON, OFF ou ON-OFF. As células ganglionares tipo ON despolarizam na presença de luz, enquanto as tipo OFF hiperpolarizam. Já as células ganglionares ON-OFF podem ser ativadas na presença ou ausência de estimulação luminosa, sendo sensíveis a variações de iluminação (JOSELEVITCH, 2008; De MONASTERIO; GOURAS; TOLHURST, 1975; GOURAS, 1968). Com isso, as células ganglionares ligam-se preferencialmente às células bipolares com

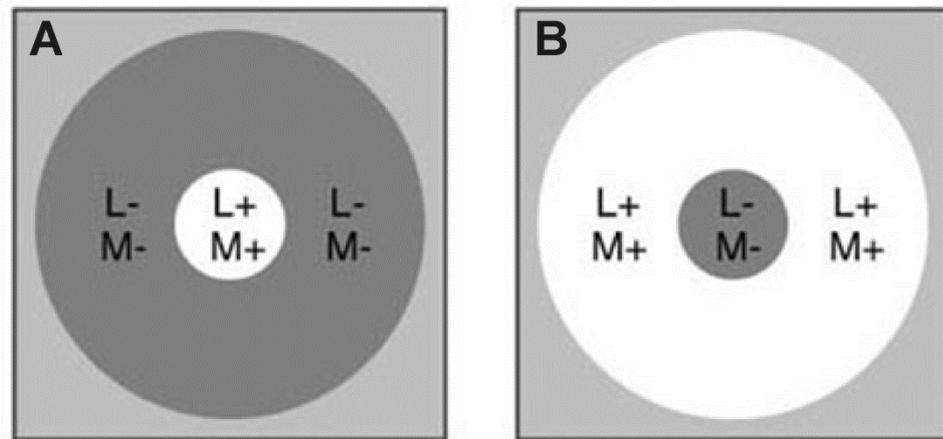
a mesma distribuição ON-OFF entre centro e periferia (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002; De MONASTERIO; GOURAS; TOLHURST, 1975; LENT, 2010).

Na retina de primatas, as células ganglionares são geralmente classificadas em células ganglionares anãs ou *midget* (atualmente conhecidas como células P), *parasol* (atualmente células M) e células ganglionares K (Figura 9). As células P correspondem a 80% das células ganglionares da retina, enquanto as células M correspondem a 10% e as células K correspondem aos restantes 10%. Esta classificação foi feita com base na morfologia e fisiologia celular e nos tipos de informações provenientes de cones que são transmitidas a elas (DACEY, 1999; HECKENLIVELY; ARDEN, 2006).



**Figura 9.** Representação esquemática da morfologia dos três tipos de células ganglionares de primatas: célula ganglionar P; célula ganglionar M e célula ganglionar K do tipo biestratificada (Adaptado de Dacey & Lee, 1994).

As células ganglionares do tipo *parasol* ou M podem ser identificadas por suas características morfológicas e fisiológicas. Morfologicamente, estas células possuem corpos celulares pequenos e árvore dendrítica densamente ramificada (DACEY, PETERSEN, 1992). Funcionalmente, estas células respondem de maneira transiente a estímulos luminosos acromáticos na mesma frequência da estimulação. Estas células apresentam alta sensibilidade ao contraste de luminância (KAPLAN; SHAPLEY, 1986) e tem saturação da resposta em contrastes intermediários e altos. A resposta destas células para estímulos cromáticos ocorre no dobro da frequência da estimulação (LEE; MARTIN; VALBERG, 1989; LEE et al, 1990) com baixa sensibilidade ao contraste de cor. Estas células recebem informações aditivas de cones L e M no centro e na periferia de seus campos receptivos, havendo um antagonismo espacial, porém sem antagonismo cromático, entre as regiões periféricas e centrais (Figura10). Então, como as células ganglionares M da retina fazem sinapses com neurônios das camadas magnocelulares do núcleo geniculado lateral (NGL), é provável que a via magnocelular seja a base fisiológica para a via pós-reptoral acromática de luminância (CRONER; KAPLAN, 1995; KREMERS, et al, 2010; PARRY et al, 2012; SILVEIRA et al, 2004).

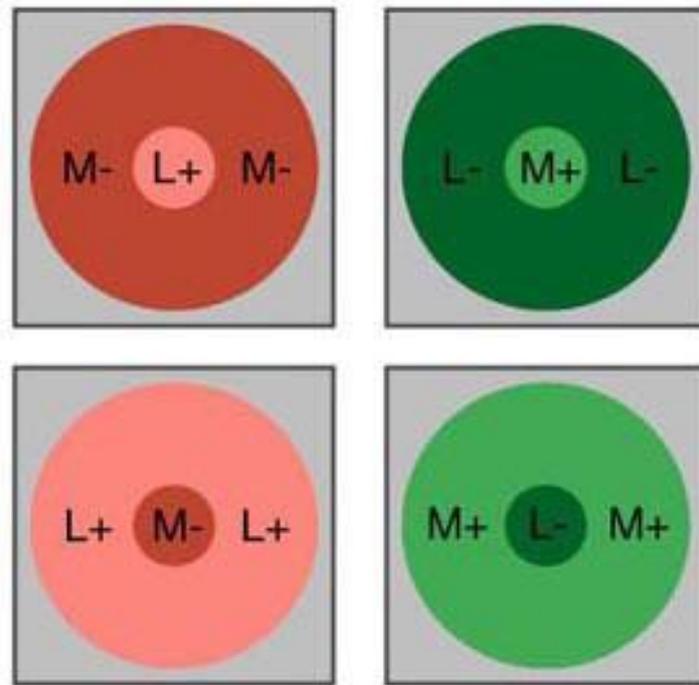


**Figura 10.** Campos receptivos de células ganglionares M, os quais são formados por regiões centrais e periféricas aproximadamente concêntricas. Ambos, centro e periferia recebem sinais dos cones M e L, mas com polaridades opostas. Essas células formam o canal que transmite informação sobre estímulos com baixo contraste de luminância ou acromático. (A) Célula M centro-ON / periferia-OFF. (B) Célula M centro-OFF / periferia-ON (Adaptado de Reid, 2003).

As células ganglionares *midget* ou P são identificadas por sua morfologia: são células pequenas, com árvores dendríticas densas e ramificação estreita (DACEY, PETERSEN, 1992). Em geral, as células P têm dimensão 3 vezes menor que uma célula M na mesma excentricidade retiniana. Por projetarem para as camadas parvocelulares do NGL, são consideradas equivalentes às células “P” de oponência espectral (CRONER; KAPLAN, 1995; DACEY, 1999). Funcionalmente, as células P respondem de maneira sustentada para estímulos luminosos de médio e alto contraste de luminância e de contraste de cor verde-vermelho. A estrutura do campo receptivo das células P mostra que o centro e a periferia do campo receptivo recebe sinais vindos de um único tipo de cone (centro – L, periferia – M ou centro – M, periferia – L, Figura 11) (CRONER; KAPLAN, 1995; DACEY, 1999; DACEY, 2000; KREMERS, et al, 2010; PARRY et al, 2012). Os sinais oponentes dos cones L e M, oriundos de quatro subclasses de células P (duas subclasses ON - centro L-ON / periferia M-OFF e centro M-ON / periferia L-OFF – e duas subclasses OFF - centro L-OFF / periferia M-ON, centro M-OFF / periferia L-ON) sinalizam ao cérebro a oponência de cores verde-vermelho. De um modo geral, é amplamente aceito que as células P, além da detecção de contrastes cromáticos, sejam sensíveis à forma e a detalhes finos dos estímulos (DACEY, 2000).

No entanto, vários autores divergem em relação à conexão de cones L e M nos campos receptivos de células ganglionares P. Existem duas hipóteses: a hipótese de conexão randômica e a hipótese de conexão seletiva de cones L e M nos campos receptivos destas células ganglionares (DACEY, 1996, 2000; LEE; KREMERS; YEH, 1998; MARTIN et al, 2001; MULLEN; KINGDOM, 1996; REID; SHAPLEY, 2002). A hipótese randômica pode ser entendida a partir do fato de que, ao contrário da retina central, a partir de 7° de excentricidade, a convergência de células bipolares *midget* para o centro e periferia dos campos receptivos das células ganglionares se intensifica (DACEY, 2000). Uma vez que a distribuição de cones L e M na retina humana é aleatória (ROORDA et al, 2001), é razoável pensar que a conexão de apenas um tipo de cone L ou M para o centro e periferia dos campos receptivos de células ganglionares é perdida à medida que se vai em direção a retina periférica. Isto está de acordo com estudos psicofísicos que mostram que a sensibilidade ao contraste cromático diminui a partir da fóvea até valores de 30 graus, o que não indica uma excentricidade tão elevada apesar de se considerar um campo receptor nessa excentricidade como parte da retina periférica (MULLEN; KINGDOM, 1996). Esses dados sugerem que a conexão de cones L e M nos campos receptivos de células parvocelulares é randômica.

A conexão randômica é corroborada por alguns trabalhos (DACEY, 1996, 2000; MULLEN; KINGDOM, 1996) e questionada por outros (REID; SHAPLEY, 2002; LEE et al, 1998; MARTIN et al, 2001). Martin et al (2001) analisou campos receptores de células ganglionares P em justaposição ao mosaico de cones L e M na retina de primatas tricromatas entre 20 e 50 graus, e concluiu que se forem considerados os formatos reais de campos receptores dessas células (aproximadamente elípticos), existe a possibilidade de seletividade de conexão de cones L e M no centro e periferia dos campos receptivos, o que justifica a presença de forte oponência de cores verificada no registro eletrofisiológico extracelular de células ganglionares P da retina periférica, ainda que estas recebam convergência de células bipolares *midget* (MARTIN et al, 2001).



**Figura 11.** Tipos de campos receptores de células ganglionares P que apresentam propriedades de oposição de cor. Juntas, essas células formam o canal que transporta informação sobre o contraste de cor verde-vermelha pela comparação entre as taxas de absorção de cones L e M. (Adaptado de Reid, 2003).

As células K compreendem a um grupo heterogêneo de células ganglionares retinianas que não são do tipo M ou tipo P. Dentre as células ganglionares inclusas dentro do grupo K podemos citar as células ganglionares biestratificadas de corpo pequeno e células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis. A descrição morfológica e funcional de cada subtipo de célula ganglionar K é escassa (DACEY, 2000; SMAJDA; GRÜNERT, MARTIN, 2008).

As células ganglionares biestratificadas de corpo pequeno, possuem árvore dendrítica com ramificação similar às células M. Estas células recebem sinais oponentes vindos dos cones-S e da adição dos cones L e cones M. Estas células possuem resposta sustentada tipo ON a estímulos com modulação em fase de cones S, ou seja, a estímulos de luminância de cromaticidade azul, enquanto apresentaram resposta tipo OFF a estímulos com modulação de luminância na cor amarela. A modulação isoluminante azul-amarela produz uma forte resposta ON para o azul. Assim, a resposta das células ganglionares biestratificadas é do tipo S-ON/(L+M)-OFF (DACEY; LEE, 1994; FIELD et al, 2007; LEE; MARTIN; GRÜNERT, 2010). Os componentes (L+M)-OFF dos campos receptivos das células ganglionares biestratificadas possuem diâmetro 50% maior do que o componente S-ON. No entanto, a resposta (L+M)-OFF é mais lenta do que a resposta S-ON e significativamente menos transiente quando comparado a resposta das células M ou *parasol* (FIELD et al, 2007).

As células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis expressam o fotopigmento melanopsina, participando do controle dos ritmos circadianos e do reflexo pupilar à luz (SOLOMON; LENNIE, 2007).

Em primatas, as células ganglionares são as únicas células na retina onde será gerado potencial de ação ao invés de potencial graduado. Os axônios destas células irão se agrupar e formar o nervo óptico, o qual sairá do olho através do disco óptico. O nervo óptico conduzirá este potencial de ação para os centros superiores de processamento visual (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002; De MONASTERIO; GOURAS; TOLHURST, 1975; LENT, 2010).

A transmissão de impulsos entre as células da retina e o núcleo geniculado lateral (NGL), e deste para o córtex visual de primatas ocorre através de três vias pós-receptorais: via magnocelular, parvocelular e koniocelular. Estas vias possuem características fisiológicas distintas, que fornecem bases para os aspectos funcionais da visão (KREMERS, et al., 2010).

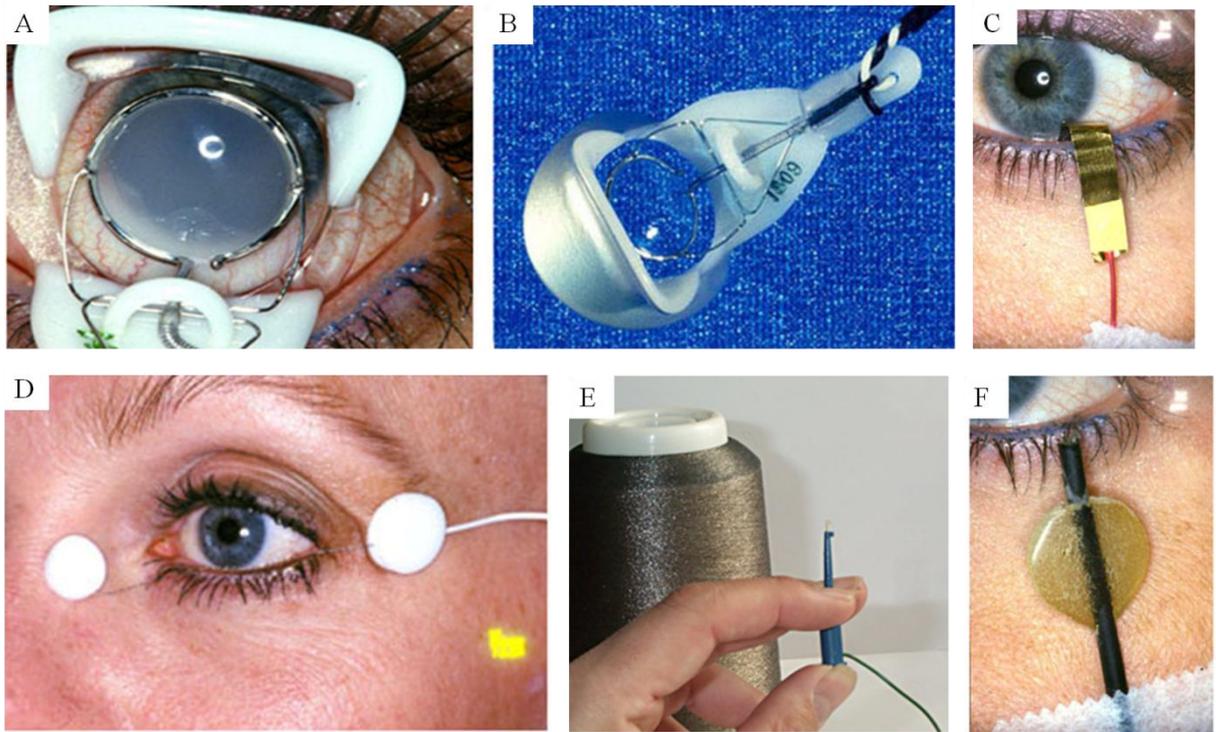
## 1.2. O ELETORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL: PRINCÍPIOS BÁSICOS

Tradicionalmente, o eletrorretinograma de campo total (*Full-field electroretinogram*, ffERG) consiste no registro em massa da atividade celular da retina em resposta a estímulos luminosos que estimulem todo o campo visual de maneira homogênea e simultânea. Este teste eletrofisiológico é amplamente utilizado para avaliar a função retiniana (BIRCH; ANDERSON, 1992; MARMOR et al, 2009).

As ferramentas mais importantes para a realização do eletrorretinograma (ERG) são a fonte de estimulação luminosa e os eletródios que irão captar os potenciais gerados nas células da retina em resposta a essa estimulação (HOLDER et al, 2010; MARMOR et al, 2009; WOLPERT; TSANG, 2011). Os estímulos visuais são gerados em uma cúpula que contém uma fonte luminosa em seu interior, os quais emitem *flashes* em diferentes intensidades luminosas e fornecem iluminação de fundo difusa, permitindo a estimulação uniforme de todo o campo visual. Por este motivo, esse equipamento é chamado de *Ganzfeld*, que, em alemão, significa campo total (HOLDER et al, 2010; MARMOR et al, 2009).

Os registros eletrorretinográficos são obtidos de maneira não invasiva, através da utilização de basicamente um canal de eletródios compostos por um eletródio ativo, um eletródio de referência e um eletródio terra. Tanto o eletródio terra, quanto o eletródio de referência são posicionados na superfície cutânea. Os eletródios terra geralmente são posicionados na frente ou no lobo da orelha, enquanto o eletródio de referência pode ser colocado na borda orbital, lateralmente ao olho no qual será registrado o eletrorretinograma. Não é recomendado que o eletródio de referência seja posicionado na frente, devido ao risco de “contaminação” do sinal eletrorretinográfico pelo quiasma óptico (*ocular crossover*) ou por potenciais corticais provocados (HOLDER et al, 2010; MARMOR et al, 2009).

Já os eletródios ativos, responsáveis pela captação dos sinais gerados nas células retinianas podem ser de diversos tipos. Podem ser utilizados eletródios em forma de lente de contato, posicionados na córnea, como os eletródios dos tipos Burian - Allen ou ERG – Jet; eletródios posicionados na conjuntiva, como os eletródios do tipo Dawson, Trick and Litzkow (DTL) e eletródios em forma de folhas de ouro; ou eletródios de superfície, que são posicionados na superfície cutânea da pálpebra inferior (Figura 12) (HOLDER et al, 2010; MARMOR et al, 2009; WOLPERT; TSANG, 2011).



**Figura 12.** Tipos de eletrodos ativos utilizados no ERG. (A) Eletrodo Burián-Allen posicionado no globo ocular. (B) Eletrodo Burián-Allen. (C) Eletrodo em forma de folha de ouro. (D) Eletrodo DTL posicionado na conjuntiva. (E) Rolo de DTL. (F) Um tipo de eletrodo de superfície (A, B, C, D e F - Adaptado de <http://www.webvision.med.utah.edu>. E – adaptado de <http://www.michaelbach.de>).

Os eletródios frequentemente utilizados são os eletródios dos tipos Burian-Allen e DTL. O eletródio Burian-Allen é formado por uma lente de contato com uma superfície condutora ao longo de sua borda. Estes eletródios são colocados sobre a córnea, evitando os atos de piscar ou movimentar voluntariamente o globo ocular, obtendo sinais com maiores amplitudes e registros mais estáveis, com menor interferência de ruído elétrico. No entanto, este eletródio exige o uso de colírio anestésico, devido ao desconforto causado pelo seu posicionamento, impedindo a realização de registros muito longos. Além disso, por estar em contato direto com a córnea, há um maior risco de provocar lesões abrasivas na mesma (BEREZOVSKY et al, 2008; HOLDER et al, 2010; MARMOR et al, 2009; WOLPERT; TSANG, 2011).

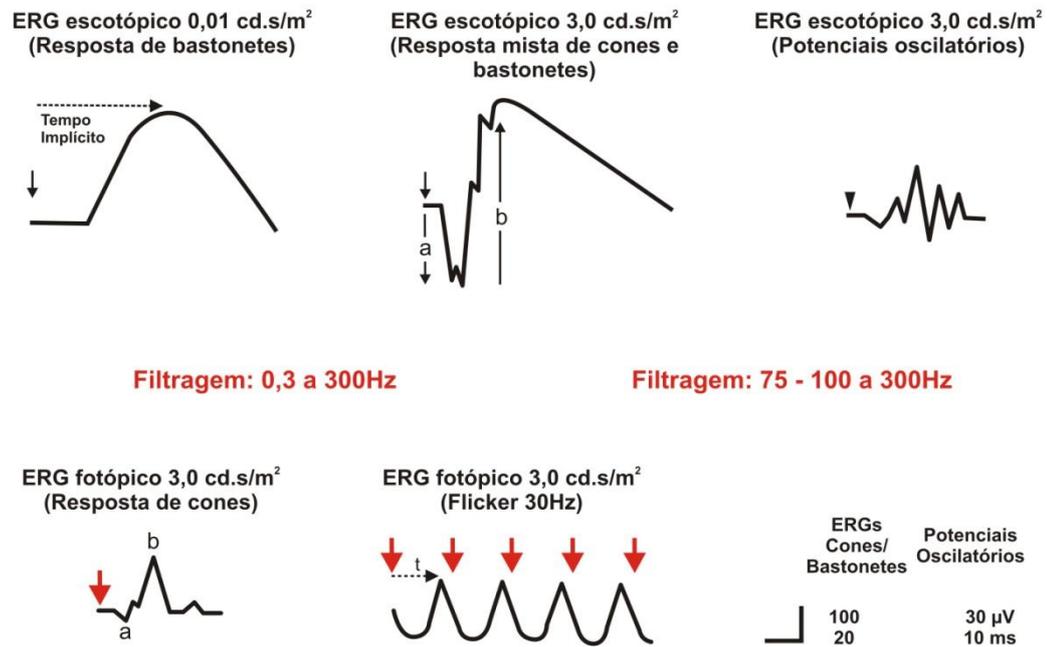
Já o eletródio do tipo DTL, por consistir em um fino fio de *nylon* posicionado ao longo da pálpebra inferior ou no saco conjuntivo, é menos invasivo e mais confortável, pois não entra em contato direto com a córnea, sendo mais aceito pela maioria dos pacientes. Outras vantagens do DTL são o seu baixo custo, não necessita de colírio anestésico e possibilita a realização de registros mais longos. A sua desvantagem é a de permitir movimentos oculares, produzindo sinais eletrorretinográficos aproximadamente 10% mais fracos do que os obtidos com o Burian-Allen (BEREZOVSKY et al, 2008; DAWSON; TRICK; LITZKOW, 1979; MARMOR et al, 2009; WOLPERT; TSANG, 2011; YIN; PARDUE, 2004).

Sem considerar as variações inerentes ao protocolo de registro utilizado, como a escolha da intensidade e duração do estímulo, o tipo de eletródio ou o estado de adaptação, podem ser observados vários fatores que podem alterar os resultados do eletrorretinograma. São eles: a dilatação da pupila, o uso de determinados medicamentos e alterações na pressão arterial sistêmica ou no fluxo sanguíneo local. Como o ERG registra basicamente a resposta celular à luz, o estado de dilatação da pupila influenciará fortemente o potencial registrado. Com isso, a pupila deverá estar em seu estado máximo de dilatação (aproximadamente oito milímetros) para produzir uma resposta máxima. O ERG realizado com a pupila insuficientemente dilatada registrará um sinal reduzido (WOLPERT; TSANG, 2011).

No ERG *full-field* (FF), os potenciais gerados dependem fundamentalmente das características temporais e espectrais do estímulo, assim como do estado de adaptação do indivíduo. A sociedade internacional de eletrofisiologia clínica da visão (ISCEV – *The International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*) padronizou os parâmetros de aplicação do eletrorretinograma clínico, assim como a análise e interpretação dos resultados obtidos (HOLDER et al, 2010; MARMOR et al, 2009).

O tipo de ERG considerado pela ISCEV como “padrão” é o ERG de “*Flash único*” ou “*Single Flash ERG*”, que pode ser obtido pela emissão de um único *flash* a cada intervalo de tempo, com intervalos que podem variar de 1 a 20 segundos, de acordo com a intensidade do estímulo e o estado de adaptação. Os potenciais obtidos correspondem a componentes negativos (onda *a*) e positivos (onda *b*). Outro tipo de estimulação é chamado de *Flicker*, no qual há uma variação da frequência temporal de estimulação, sendo emitidos vários “*flashes*” por segundo e gerando vários componentes positivos e negativos com a mesma amplitude. No ERG clínico foi padronizado o *Flicker* de 30 Hz, com apresentação de 30 *flashes* por segundo. Na pesquisa básica, a variação da frequência temporal depende dos objetivos de cada pesquisa (HOLDER et al, 2010; MARMOR et al, 2009).

De acordo com a ISCEV, cada tipo de estimulação possui uma forma de onda característica, analisada pela mensuração das amplitudes das ondas *a* (entre a linha de base e o ponto mais negativo da onda) e *b* (entre o ponto mais negativo e o ponto mais positivo da onda - pico-a-pico), e do tempo implícito, que é o tempo decorrido entre a geração do estímulo e o pico máximo da onda. As ondas obtidas pelos tipos diferentes de estimulação padronizados pela ISCEV podem ser observadas na Figura 13 (MARMOR et al, 2009).



**Figura 13.** Ilustração que mostra as formas de onda obtidas de acordo com o estímulo emitido no eletrorretinograma de campo total padronizado pela ISCEV (Adaptado de MARMOR et al, 2009).

Ao longo dos anos, muitos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar as origens celulares das ondas do eletrorretinograma. Um método que se mostrou bastante eficaz para a identificação das células responsáveis pela geração de cada componente do eletrorretinograma foi o “bloqueio” destes componentes com o uso de substâncias químicas. Estas substâncias interrompem a transmissão entre células específicas ou provocam alguma lesão nas mesmas, inibindo a sua atividade (BUSH; SIEVING, 1994; FRISHMAN; SIEVING, 1995; GARGINI et al, 1999).

Bush e Sieving (1994), na tentativa de determinar se a onda *a* seria gerada exclusivamente por fotorreceptores, injetaram análogos do glutamato no humor vítreo em macacos. Estes autores concluíram que a onda *a* obtida em condições de adaptação fotópica deriva parcialmente da atividade pós-sináptica de cones, especialmente próximo ao limiar do ERG fotópico utilizado no ERG clínico. Já os resultados obtidos por Quiu et al (2002) após provocar lesões em áreas diferentes da retina indicam que o tempo implícito desta onda é gerado exclusivamente por fotorreceptores.

Posteriormente, outros autores demonstraram que o início da atividade da onda *a* (6 a 10 ms iniciais) é produzida por ação dos fotorreceptores, enquanto a inclinação da onda é resultado da ação de células gliais em resposta à redução de potássio no fotorreceptor (HOLDER et al, 2010).

Alguns estudos sugerem que as células bipolares OFF possuem um papel importante na geração da onda *a*. Esta conclusão foi tomada a partir de um experimento no qual a utilização de PDA (ácido piperidinedicarboxílico) provocou redução na amplitude até o bloqueio completo desta onda. Como o PDA é uma substância responsável por bloquear a transmissão de sinais entre os fotorreceptores e as células bipolares OFF e horizontais e entre as células bipolares ON e OFF e as células ganglionares e amácrinas, torna-se evidente a participação das células bipolares OFF na geração da onda *a* (BUSH; SIEVING, 1994; MIURA et al, 2009).

Já a onda *b*, reflete a atividade de células bipolares ON e das células de Müller proximais em resposta à liberação de potássio pelas células bipolares ON (FRISHMAN; SIEVING, 1995).

Gargini et al (1999), confirmaram a afirmação acima após realizarem experimentos utilizando a droga 2-Amino-4-phosphonobutyrate (APB), substância análoga ao glutamato, que bloqueia a transmissão sináptica entre fotorreceptores e células bipolares ON. Tais autores observaram que houve redução na resposta do componente positivo (onda *b*) do eletrorretinograma, sem reduzir o componente negativo, o que significa que a onda *b* seria

gerada principalmente pelas células bipolares ON. No mesmo estudo, outra substância injetada foi o bário, o qual bloqueia os canais de potássio e com isso as células de Müller. Não foi possível identificar os componentes do ERG após a aplicação desta substância, corroborando a participação das células de Müller na geração da onda *b* (GARGINI et al, 1999).

De modo geral, os componentes da resposta eletrorretinográfica resultam da interação complexa entre a atividade de fotorreceptores e contribuições pós-receptorais de neurônios de segunda ordem, como células bipolares ON e OFF, células horizontais e células de Müller (BUSH; SIEVING, 1994; FRISHMAN; SIEVING, 1995; GARGINI et al, 1999).

Portanto, por refletir o funcionamento das camadas celulares da retina de uma forma confiável, o eletrorretinograma é empregado com muita frequência na prática clínica, tanto como diagnóstico, quanto como um recurso para acompanhar a evolução de uma série de doenças que afetam as células retinianas, como por exemplo: doenças genéticas como Retinose Pigmentado, doença de *Stargardt* ou distrofia de cones e bastonetes; doenças vasculares, inflamatórias ou degeneração causada pelo efeito tóxico de drogas, medicamentos ou outras substâncias químicas (BIRCH; ANDERSON, 1992; BEREZOVSKY et al, 2008; MARCUS; CABAEL; MARMOR, 2006; PARANHOS; PARANHOS JR; NEHEMY, 2002; PEREIRA et al, 2003).

Uma série de estudos vem reconhecendo o ERG como uma ferramenta importante para avaliar a função das porções distais da retina, através de métodos desenvolvidos para obter respostas isoladas de fotorreceptores, especialmente cones L e M. Além disso, muitos estudos vêm demonstrando evidências de que o ERG também pode fornecer informações acerca da função pós-receptoral das camadas internas da retina. Os sinais pós-receptorais de cones L, M e S, combinam-se de maneiras diferentes, formando vias de processamento paralelo para as informações de cor e luminância. O método da substituição silenciosa, que isola as respostas de um único fotorreceptor, e que, portanto, permite o estudo mais detalhado das vias cromáticas e de luminância será descrito a seguir (BUSH; SIEVING, 1996; CHALLA et al, 2010; KREMERS; LINK, 2008; KREMERS et al, 2010; MCKEEFRY et al, 2014; PARRY et al, 2012).

### 1.3. ELETORRETINOGRAMA COM ISOLAMENTO DE CONES: O MÉTODO DE SUBSTITUIÇÃO SILENCIOSA

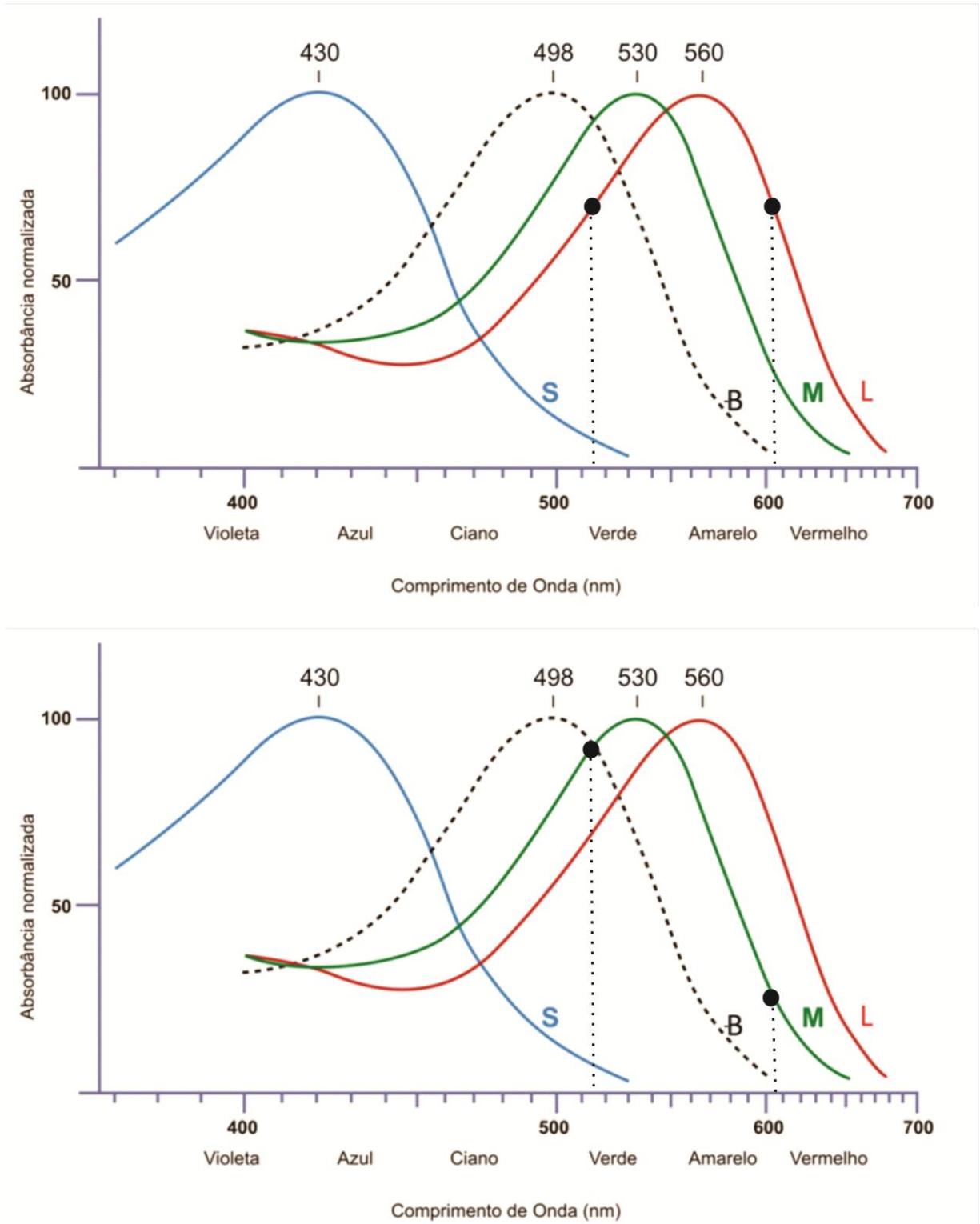
O isolamento das respostas eletrorretinográficas específicas de uma determinada classe de fotorreceptor cone é vantajosa por uma série de razões, dentre as quais se encontra a possibilidade de diagnosticar e monitorar a progressão e o tratamento de desordens retinianas que comprometam o funcionamento adequado da via mediada pelo específico fotorreceptor (KREMERS, 2003). Como os fotorreceptores possuem susceptibilidade variada a processos patológicos diferentes, o isolamento de suas respostas eletrofisiológicas permite a avaliação objetiva do funcionamento de sua via eferente, quando estes receptores são acometidos por patologias retinianas hereditárias ou adquiridas, que envolvam estruturas pós-receptorais (KREMERS, 2003; KREMERS; LINK, 2008; MCKEEFRY et al, 2014).

De fato o ERG com isolamento de cones se mostrou extremamente útil para o diagnóstico e elucidação da fisiologia de diversas alterações na retina como retinose pigmentada (SCHOLL; KREMERS, 2001; 2003), doença de *Stargardt* (SCHOLL et al, 2001) e distrofia de cones (SCHOLL; KREMERS, 2003). Outra grande vantagem é a possibilidade de estudar a distribuição espacial relativa dos diferentes tipos de cone (MCKEEFRY et al, 2014).

Após a apresentação de uma série de vantagens, torna-se fundamental o entendimento sobre o que é realmente o isolamento de cones, e sobre como é possível realizá-lo. O método de substituição silenciosa foi desenvolvido por Estévez e Spekheijse (1974), na época, chamado por estes autores de “método da compensação espectral”. Este método consiste na obtenção de resposta exclusiva da mudança do estado de excitação de apenas um tipo de fotorreceptor a uma dada estimulação, enquanto o estado de excitação dos demais tipos de fotorreceptores não modifica, por isso diz-se que os demais fotorreceptores encontram-se “silenciados”. Este “silenciamento” ocorre devido à estimulação ser composta por duas fases temporais nas quais a composição espectral da luz utilizada em cada fase excita igualmente os vários tipos de fotorreceptores, com exceção de um (ESTÉVEZ; SPEKHEIJSE, 1974).

Portanto, o conhecimento da curva de absorção espectral dos fotorreceptores e do espectro de emissão das fontes de luz permite a escolha dos comprimentos de onda destas fontes de estimulação, de modo que a alternância entre os dois feixes de estimulação não causará alterações na absorção de fótons por um tipo específico de fotorreceptor (cone L, por exemplo), enquanto, simultaneamente, causará a mudança da absorção do número de fótons em outro tipo de fotorreceptor (cone M, por exemplo) (ESTÉVEZ; SPEKHEIJSE, 1974,

1982; KREMERS, 2003). A Figura 14 corresponde a um exemplo simplificado de como ocorre a estimulação.



**Figura 14.** Ilustração que exemplifica o tipo de estimulação utilizado no método de substituição silenciosa. Os círculos pretos sobre as curvas de sensibilidade espectral de cones L e M correspondem aos pares de estímulos luminosos com comprimentos de onda selecionados, de modo que cones L sejam silenciados, enquanto cones M são estimulados. As linhas tracejadas indicam os pontos de estimulação correspondentes em cones L e M (Adaptado de Estévez; Spekhejse, 1974).

A ausência de mudanças no estado de excitação de um tipo de fotorreceptor pelo método de substituição silenciosa pode ser entendida pelo “Princípio da Univariância de Rushton”, o qual afirma que, para cada classe de fotorreceptor, o sinal de hiperpolarização após a absorção de um fóton será sempre o mesmo, independentemente do comprimento de onda deste fóton. E como os dois comprimentos de ondas usados no método de substituição silenciosa apresentam uma mesma probabilidade de terem seus fótons absorvidos por um determinado fotorreceptor cone, a magnitude da hiperpolarização provocada será aproximadamente a mesma (ESTÉVEZ; SPEKHEIJSE, 1982; RUSHTON, 1972).

A descrição acima corresponde ao método “genérico” de substituição silenciosa, desenvolvido na década de 1970, no qual não foram consideradas as modulações dos outros tipos de fotorreceptores. Sendo assim, por exemplo, quando um estímulo era gerado com o objetivo de obter resposta isolada de cones L, havia o silenciamento de cones M, porém sem controlar a atividade de cones S ou de bastonetes. Alguns estudos utilizaram o método da “dupla substituição silenciosa”, no qual era possível silenciar, além de cone L ou M, a resposta de bastonetes (BRAINARD et al, 1999; CHALLA et al, 2010; KREMERS; MEIERKORD, 1999; MURRAY et al, 2004).

Na dupla substituição silenciosa, o isolamento de cones é obtido com a utilização de um monitor CRT (tubos de raios catódicos). A estimulação é realizada pela multiplicação dos espectros de energia de apenas três primárias (fósforos vermelhos, verde e azul) pelos espectros de absorção das três classes de cone, para então calcular as combinações nas quais será possível obter a substituição silenciosa. Já o silenciamento de bastonetes é obtido pela utilização da “Função de sensibilidade espectral escotópica  $V'(\lambda)$ ”, a qual permite a escolha de pares de comprimentos de ondas que não são capazes de produzir excitação de bastonetes. No entanto, nenhum tipo de controle foi realizado sobre as resposta de cones S (CHALLA et al, 2010; MURRAY et al, 2004; MURRAY; KREMERS; PARRY, 2008).

No método de dupla substituição silenciosa, devido a apresentação do estímulo ocorrer em monitores CRT, foram observadas algumas desvantagens. A sobreposição espectral na emissão dos fósforos presentes no monitor limitaram a profundidade da modulação de estimulação dos contrastes de cone, obtendo valores máximos de luminância considerados baixos, especialmente para as respostas eletrorretinográficas de cones M, que tendem a ser mais fracas do que as respostas de cones L (MURRAY; KREMERS; PARRY, 2008).

Deste modo, com estimuladores CRT não é possível isolar a resposta de apenas um tipo de fotorreceptor, já que com três tipos de fontes de luz (fósforos vermelhos, verde e azul) não é possível controlar a resposta de quatro tipos de fotorreceptores. Assim, para obter o

isolamento efetivo de apenas um tipo de fotorreceptor, o número de primárias necessárias para a estimulação deve ser pelo menos igual ao número de tipos de fotorreceptores diferentes, ou seja, quatro (KREMERS; CZOP; LINK, 2009; KREMERS; PANGENI, 2012).

Portanto, para o isolamento de um único fotorreceptor, podem ser utilizados estimuladores do tipo *Ganzfeld*, que possuam pelo menos quatro primárias, ou seja, quatro LED's (diodos emissores de luz) acoplados em seu interior, que possam ser moduladas de maneira independente (KREMERS; PANGENI, 2012; SHAPIRO; POKORNY; SMITH, 1996). Este método é chamado de tripla substituição silenciosa, e foi utilizado pela primeira vez em 2012, por Kremers e Pangeni, na Alemanha (KREMERS; PANGENI, 2012). A tripla substituição silenciosa mostrou-se como uma técnica ainda mais poderosa para o estudo dos sinais eletrorretinográficos isolados de fotorreceptores, permitindo também o estudo de suas vias pós-receptorais (KREMERS; PANGENI, 2012).

#### 1.4. O ELETORRETINOGRAMA NO ESTUDO DAS VIAS VISUAIS DE COR E LUMINÂNCIA

Existem fortes evidências de que o eletrorretinograma (ERG) realizado com estimulação do tipo *flicker*, que contém informações de luminância ou de oponência cromática verde-vermelho seja governado por dois mecanismos que provavelmente refletem a atividade das vias retino-geniculado-corticais magno e parvocelular (CHALLA et al, 2010; KREMERS; LINK, 2008; KREMERS et al, 2010; PARRY et al, 2012). Em frequências temporais altas (> 30 Hz), o ERG possui propriedades que se comparam àquelas da via magnocelular. Em frequências temporais intermediárias (8-12 Hz) o ERG possui propriedades reminiscentes às do canal cromático verde-vermelho, baseadas na atividade da via parvocelular (CHALLA et al, 2010; KREMERS; LINK, 2008; KREMERS et al, 2010; PARRY et al, 2012).

Estímulos que isolam as respostas de cones L e M ao eletrorretinograma contêm tanto informações de luminância quanto informações cromáticas verde-vermelho. Isso permite que estes estímulos sejam usados para estudar a ativação de cones para as duas vias pós-receptorais. Com isso, a força relativa dos sinais gerados pelos cones M e L na resposta eletrorretinográfica pode ser estimada em ambos os canais, de luminância e cromático (MURRAY et al, 2004; KREMERS et al, 2000).

Foi encontrado que, apesar da razão entre as respostas de cones L e M apresentarem uma grande variabilidade individual, ela geralmente é maior do que a unidade quando o ERG

é medido com estímulos em frequências temporais altas, concordando com achados psicofísicos relacionados ao canal de luminância (KREMERS et al, 2000). Esta razão de resposta L/M pode apresentar então uma forte relação com a razão entre a quantidade de cones L e M na retina (BRAINARD et al, 2000) e com a razão entre a densidade de fotopigmento de cones L e M (KREMERS et al, 2000). Em contraste, o valor da razão L/M é próximo à unidade no canal cromático verde-vermelho e com ERG medido com estimulação do tipo *flicker*, com frequência de 12 Hz (CHALLA et al, 2010; KREMERS; LINK, 2008).

#### 1.5. O ELETORRETINOGRAMA COMO MEDIDA PARA AVALIAR A DISTRIBUIÇÃO DE CONES L E M NA RETINA

A distribuição de cones L e M vêm sendo estudada usando várias técnicas. Métodos de óptica adaptativa vêm revelando o padrão de distribuição de cones L e M na retina central (HOFER et al, 2005). A expressão de genes, medida através da expressão de RNA mensageiro (RNAm) pelo fotopigmento de cones, pode fornecer uma estimativa confiável da distribuição de cones L e M também em maiores excentricidades na retina. Isto ocorre, pois os cones L e M produzem a mesma quantidade de RNAm. Portanto, é possível analisar as diferenças na distribuição de cones entre a retina central e periférica, sendo observado que a razão da expressão de RNAm entre os cones L e M, aumenta de acordo com o aumento da excentricidade retiniana (HAGSTROM; NEITZ J; NEITZ M, 1998, 2000).

Além disso, dados de eletrorretinograma podem revelar mudanças similares nas razões de sinais de cones L e M dependentes da excentricidade retiniana. Kuchenbecker e colaboradores (2008) desenvolveram um equipamento para o registro do ERG multifocal com um campo amplo, utilizando como fontes de luz lâmpadas de LED nas cores verde e vermelho. Os autores reportaram um grande aumento na sensibilidade ao estímulo vermelho em comparação ao estímulo verde na retina mais periférica, sugerindo um aumento na razão L/M em função da excentricidade.

Challa e colaboradores (2010) usaram o método de dupla substituição silenciosa para investigar as respostas isoladas de cones L e M ao eletrorretinograma com estimulação do tipo *flicker*, em duas frequências temporais (12 e 30 Hz) e em configurações espaciais de estimulação diferentes. Como foi utilizado o método da dupla substituição silenciosa, além do tipo de cone que estava sendo examinado, não foi possível controlar uma contribuição

adicional de cone S, apesar dos autores afirmarem que esta contribuição não apresentou um impacto significativo na resposta de eletrorretinograma.

Os resultados obtidos no trabalho de Challa e colaboradores (2010) mostraram que em 12 Hz a razão L/M foi aproximadamente igual à unidade para todos os estímulos, sugerindo que as respostas são mediadas pelo mecanismo de oponência de cones e não variam com a excentricidade retiniana. Já com 30 Hz, a razão L/M dependeu fortemente do tamanho da estimulação, indicando que a força de ativação relativa de cones L e M para mecanismos não-oponentes varia de acordo com a excentricidade retiniana, o que confirma os dados previamente apresentados (MURRAY et al, 2004).

No entanto, para um completo isolamento das respostas de cones L e M, é necessária a utilização do método de tripla substituição silenciosa, no qual, três tipos de fotorreceptores são silenciados, enquanto apenas um tipo de fotorreceptor (cone L ou M) é estimulado. Este método somente pode ser realizado com estimuladores que tenham pelo menos quatro primárias independentes (SHAPIRO; POKORNY; SMITH, 1996).

O completo isolamento de cones não foi alcançado em experimentos eletrofisiológicos prévios, que utilizaram como estimuladores monitores CRT (CHALLA et al, 2010; KREMERS; LINK, 2008) ou apenas LED's com duas primárias (KUCHENBECKER et al., 2008). O método de tripla substituição silenciosa também foi verificado em dicromatas, que não possuíam cones L ou M (KREMERS; PANGENI, 2012; MCKEEFRY et al, 2014). Outra desvantagem dos métodos anteriores foi a impossibilidade de realizar a estimulação completa da retina (*full-field*). Deste modo, não foi possível estudar a distribuição espacial dos sinais de cones L e M na periferia da retina (além de aproximadamente 50°).

Portanto, faz-se necessário o estudo detalhado da distribuição espacial das respostas eletrorretinográficas de cones L e M, refletindo a atividade sugestiva de duas vias pós-receptorais (provavelmente parvocelular e magnocelular) durante a utilização do método de tripla substituição silenciosa. Para que os sinais eletrorretinográficos de cones L e M possam ser estudados em toda a retina, devem ser incluídas condições nas quais são também estimulados os cones da retina mais periférica. Para tal, deve ser utilizado um estimulador do tipo *Ganzfeld* com quatro tipos diferentes de diodos emissores de luz (LEDs) integrados em seu interior.

## 2. JUSTIFICATIVA

Avanços recentes têm permitido não somente o estudo da contribuição de cada fotorreceptor a resposta do ERG, mas também da contribuição das vias de processamento de cor e luminância. Isso eleva fortemente o valor do ERG, já que o mesmo pode ser usado para estudar questões básicas do processamento visual na retina usando uma técnica eletrofisiológica objetiva e não-invasiva em humanos. No entanto, em estudos anteriores não foi possível obter as respostas de cones L e M em todas as áreas da retina. A partir disso, o presente trabalho é justificado pela necessidade de estudo da distribuição espacial das respostas dos fotorreceptores (cones L e M) em vias pós-receptorais (de cor e luminância) em humanos, usando uma técnica não invasiva, o ERG. A hipótese de trabalho é de que as respostas de cones L e M, nas porções centrais e periféricas da retina são processadas de modo diferente nas vias cromáticas e de luminância. Isso é inesperado e intrigante já que esse dois tipos de cones são bioquimicamente idênticos e diferem basicamente em poucas sequências de aminoácidos em seu fotopigmento. No entanto, a abundância desses cones na retina difere (a maioria das pessoas possui mais cones L do que M), o que pode influenciar o modo pelo qual seus sinais são processados.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

- Estudar a distribuição espacial das respostas eletrorretinográficas com isolamento de cones L e M durante a utilização do método de tripla substituição silenciosa em diferentes áreas retinianas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a contribuição dos cones L e M ao eletrorretinograma medido em diferentes excentricidades da retina.
- Comparar os valores de amplitude obtidos no eletrorretinograma com isolamento de cones L e M, medidos em frequências temporais intermediárias e altas e em diferentes excentricidades da retina.
- Estimar a razão de amplitude entre as respostas eletrorretinográficas de cones L e M (razão L/M) nas diferentes excentricidades da retina.
- Comparar os valores de fase obtidos no eletrorretinograma com isolamento de cones L e M, medidos em frequências temporais intermediárias e altas e em diferentes excentricidades da retina.
- Estimar a diferença de fase entre as respostas eletrorretinográficas de cones L e M.
- Verificar a relação entre as respostas eletrorretinográficas com isolamento de cone L e M medido com frequências temporais intermediárias e altas e a atividade das vias de processamento de cor e luminância.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos durante período de doutorado sanduíche pelo programa Ciência Sem Fronteiras do Ministério da Educação do Brasil, entre 01 de março de 2013 e 28 de fevereiro de 2014, no departamento de oftalmologia da instituição Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg em Erlangen, Alemanha, sob supervisão do professor doutor Jan Kremers.

### 4.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram realizados três procedimentos experimentais nos quais participaram ao todo oito sujeitos tricromatas e sem queixas visuais.

O experimento principal (experimento 1) foi realizado com a participação de quatro sujeitos, sendo três do sexo masculino e um do sexo feminino com idades variando entre 28 e 53 anos. O experimento 2 foi realizado com 1 sujeito do sexo feminino, enquanto participaram do experimento 3, cinco sujeitos do sexo masculino com idades entre 29 e 54 anos.

Antes de iniciar os registros de ERG, todos os sujeitos foram avaliados por meio de uma ficha de anamnese (APÊNDICE 1), na qual constam dados pessoais, hábitos e itens referentes à presença de doenças sistêmicas, oculares, genéticas ou neurológicas que possam afetar as vias visuais. Também foram obtidas informações relativas à realização de cirurgias refrativas em período anterior à pesquisa. Tais informações são necessárias para identificar possíveis fatores de inclusão ou exclusão do estudo.

Após a anamnese, os indivíduos passaram por exame oftalmológico, para excluir a presença de distúrbios retinianos. Foram realizados os exames de biomicroscopia e fundoscopia, assim como a avaliação da refração e acuidade visual.

Além disso, todos foram submetidos a avaliação da visão de cores com o teste de ordenamento de matizes Farnsworth Munsell D-15 e com o anomaloscópio HMC (Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Alemanha). Os testes de avaliação da visão de cores foram aplicados para garantir que somente indivíduos tricromatas fossem submetidos ao eletrorretinograma.

Foram incluídos na pesquisa todos aqueles que se enquadraram nos critérios de inclusão e excluídos aqueles que apresentaram pelo menos um dos critérios de exclusão citados a seguir.

### *Critérios de inclusão*

- Ausência de queixas visuais;
- Ausência de alterações na visão de cores

### *Critérios de exclusão*

- Indivíduos que possuam qualquer alteração na visão de cores;
- Presença de doenças sistêmicas, genéticas ou neurológicas que afetem as vias visuais;
- Presença de doenças oculares (catarata, ceratite, conjuntivite, disfunção macular relacionada à idade, estrabismo, glaucoma, olho seco, uveíte);
- Indivíduos portadores de epilepsia;
- Indivíduos submetidos a cirurgias para correção de erros refrativos;
- Indivíduos que fazem uso de medicamentos conhecidos por afetar os resultados do eletrorretinograma;
- Alcoólatras e tabagistas;
- Pressão intra-ocular elevada;

#### **4.1.1 Aspectos Éticos**

Antes da realização dos experimentos, todos os indivíduos foram informados a respeito dos objetivos do trabalho, assim como de todos os procedimentos realizados, aceitando participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice 2). A pesquisa realizada seguiu os princípios éticos estabelecidos pela declaração de Helsinki. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da faculdade de medicina da universidade de Erlangen-Nürnberg, sob o protocolo de aprovação 4057.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Aquisição dos dados

#### 4.2.1.1. Estimulação visual

Os estímulos visuais foram gerados com o uso do sistema de registro eletrofisiológico RetiPort (Roland Consult, Stasche & Finger GmbH, Brandenburg a. d. Havel, Alemanha), e apresentados em um estimulador do tipo *Ganzfeld* (Q450SC; Roland Consult, Alemanha), contendo seis matrizes de diodos emissores de luz (LEDs) com cores diferentes, os quais podem ser modulados de maneira independente pelo sistema RetiPort. Para os presentes experimentos, foram utilizados quatro LEDs de bandas estreitas: verde, laranja, azul e vermelho.

Três experimentos diferentes foram realizados. Em todos, foram utilizados estímulos com modulação temporal senoidal que isolavam as respostas de cones L e M. Este tipo de estimulação é chamado de tripla substituição silenciosa (ESTÉVEZ; SPEKREIJSE, 1974, 1982; KREMERS, 2003; KREMERS; PANGENI, 2012). No primeiro e segundo experimento, a luminância média da luz de fundo foi de  $284 \text{ cd/m}^2$ . A cor branca (CIE1931,  $x:0,3531$ ;  $y:3181$ ) foi utilizada como cromaticidade média e a luminância para cada matriz de LED foi:  $124 \text{ cd/m}^2$  para o LED verde (523 nm, CIE1931,  $x: 0,2016$ ;  $y: 0,7371$ ),  $67 \text{ cd/m}^2$  para o laranja (594 nm, CIE1931,  $x: 0,5753$ ;  $y: 0,4240$ ),  $44 \text{ cd/m}^2$  para o azul (469 nm, CIE1931,  $x: 0,1255$ ;  $y: 0,0926$ ) e  $49 \text{ cd/m}^2$  para o vermelho (638 nm, CIE1931,  $x: 0,6957$ ;  $y: 0,2966$ ).

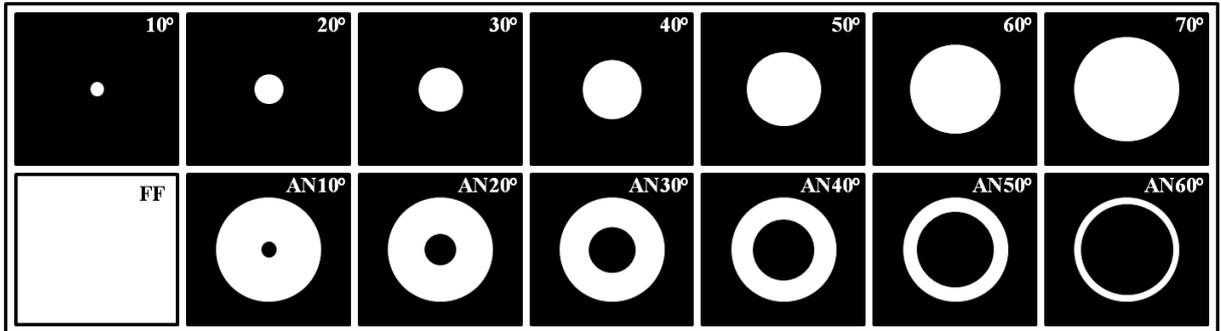
No terceiro experimento, a luminância média também foi de  $284 \text{ cd/m}^2$  (LEDs vermelho, laranja, verde e azul com luminâncias de 80, 160, 40 e  $4 \text{ cd/m}^2$  respectivamente), resultando em uma cromaticidade média avermelhada, com coordenada CIE1931:  $x = 0,5951$ ,  $y = 0,3857$ .

No primeiro e segundo experimentos, foram utilizados estímulos que isolavam a resposta de cones L e M, com contraste de cones de 10%. O contraste dos fotorreceptores silenciados foi 0%, exceto para a condição de isolamento de cones M, na qual o contraste de cone S foi -2% e o contraste de bastonetes foi 2% (o sinal negativo indica a modulação em contra-fase, enquanto o sinal positivo indica a modulação em fase). Fomos forçados a aceitar essa pequena modulação de cone S e bastonetes para garantir que fosse possível a modulação de cones M com um contraste de 10%.

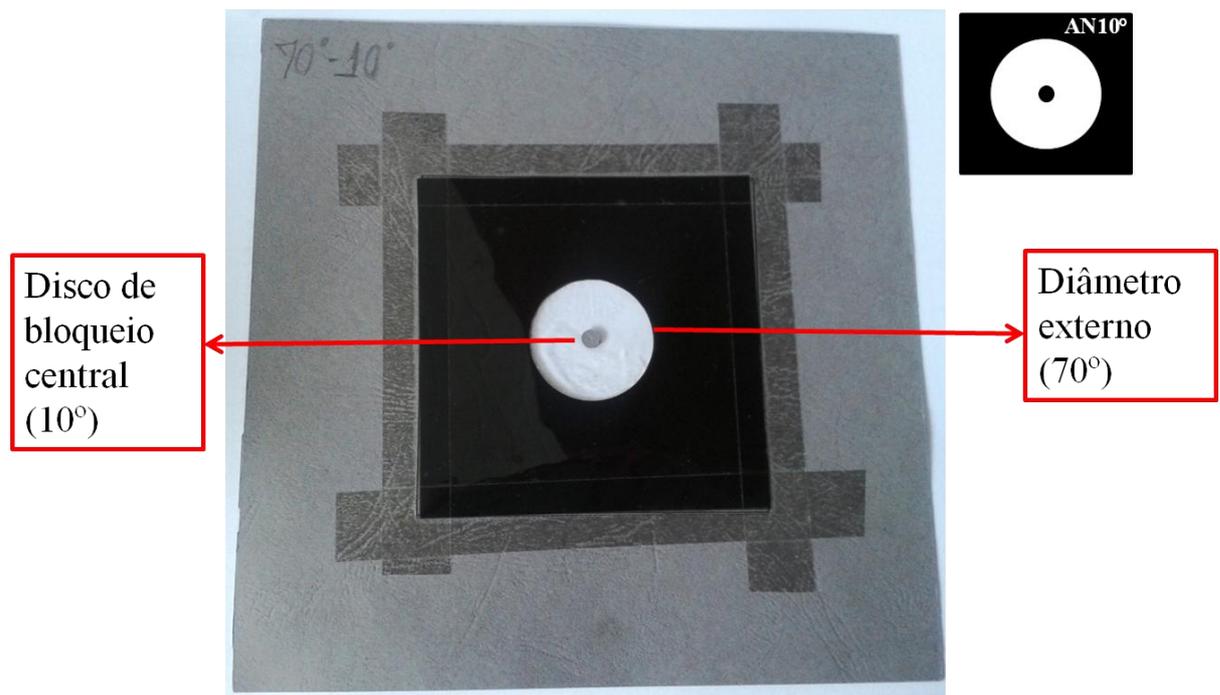
Em experimentos prévios (KREMERS; PANGENI, 2012), as respostas de amplitude para bastonetes e cones S foram menores do que as respostas de cones M, mesmo que os contrastes usados para estes fotorreceptores fossem maiores do que o contraste de cones M. A pequena modulação de bastonetes e cones S na “condição de isolamento” de cones M resultou, portanto, em respostas insignificantes. Isso é confirmado pelos resultados obtidos no presente estudo. No terceiro experimento, foram apresentadas condições de isolamento puro de cones L e M, cada um com 18% de contraste de cones e 0% de contraste dos fotorreceptores silenciados.

Para registrar o ERG em várias excentricidades retinianas, as respostas foram medidas com 14 configurações diferentes de estímulos espaciais: um tipo de estimulação de campo total (*full-field*, FF), sete estímulos circulares variando em diâmetro entre 10° e 70° de ângulo visual, em passos que correspondem a uma variação de 10°. Seis estímulos anelares com 70° de diâmetro externo e com a região central sendo gradativamente obstruída por discos que variavam em tamanho entre 10° e 60°, com variação de 10° de ângulo visual (Figura 15).

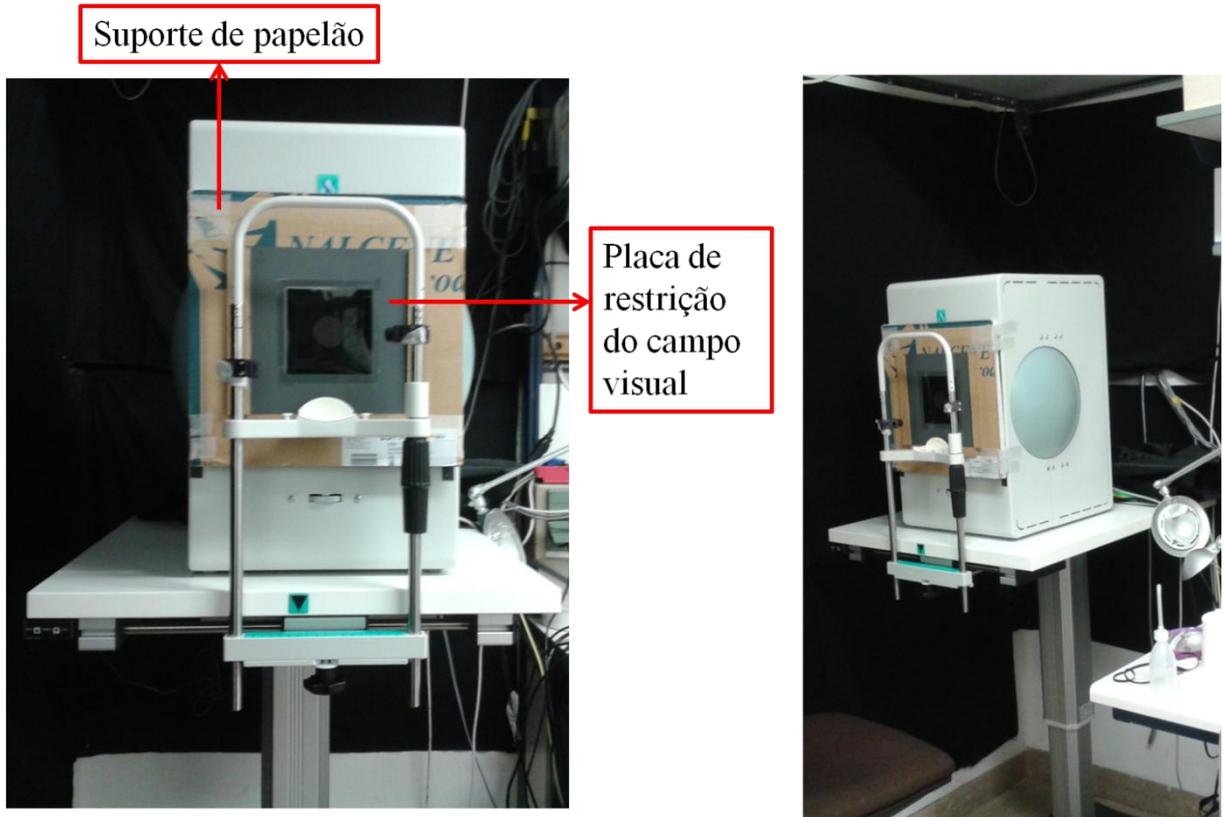
As configurações espaciais de estimulação foram criadas por placas de papel cartão que restringiam o campo visual (Figura 16), posicionadas a uma distância de três centímetros do observador (Figura 17). Uma vez que os observadores deveriam acomodar a visão a um ponto de fixação localizado dentro do estimulador *Ganzfeld*, a uma distância de 30 cm, as bordas dos estímulos ficavam extremamente “borradas”. Os experimentos 1 e 3 foram realizados em uma sala escura.



**Figura 15.** Configuração de estimulação espacial de estímulos circulares (superiores), *full-field* (FF) e estímulos anelares (inferiores) utilizados no eletrorretinograma.



**Figura 16.** Exemplo de placa de restrição visual demonstrando estímulo anelar AN10° (Fonte: dados da autora)



**Figura 17.** Estimador *Ganzfeld* com placa de restrição de campo visual acoplada (Fonte: dados da autora)

No segundo experimento, foram estudados os efeitos da luz dispersa. Neste experimento, as placas de papel cartão utilizadas apresentavam fundo branco, e os experimentos foram realizados em uma sala iluminada.

No primeiro experimento, o ERG foi medido em cinco frequências temporais: 8, 12, 30, 36 e 48 Hz para cada tipo de cone (cone L e M). O tempo total de testes para cada sujeito neste experimento correspondeu a 10 horas. Devido ao desconforto gerado pelo eletródio e pelos estímulos luminosos por um período prolongado, o experimento 1 foi realizado em sessões de 1 hora (em dias diferentes), correspondendo ao total de 10 sessões para cada sujeito.

No segundo e terceiro experimento, as frequências temporais utilizadas para estimulação corresponderam respectivamente a 12 e 30 Hz e a 12 e 36 Hz, para cones L e M. Cada um destes experimentos foi realizado em 4 sessões de 1 hora (total de 4 horas/sujeito). É necessário destacar que durante a realização do eletrorretinograma, a ordem de realização das frequências temporais, configuração espacial e tipo de cone foram selecionados aleatoriamente. A ordem aleatória de teste evita resultados que possam ser influenciados por fatores como o cansaço do paciente ao final do teste.

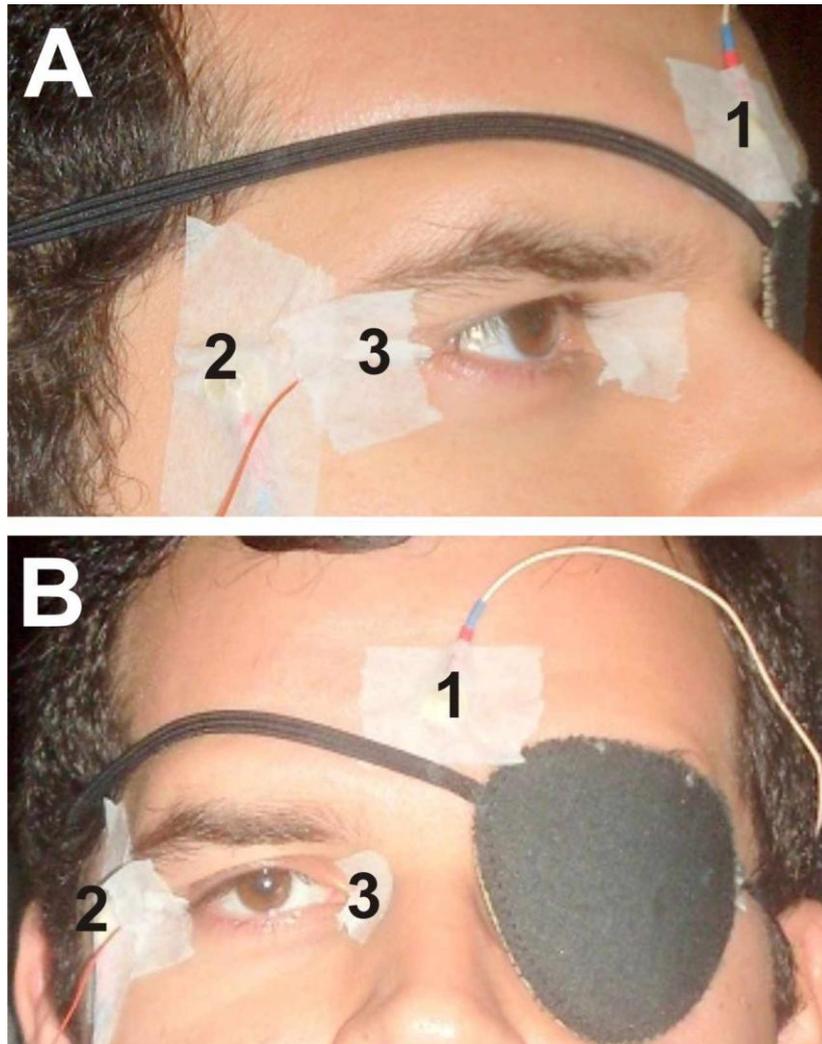
#### 4.2.1.2. Registros de ERG

##### *Registros*

O eletrorretinograma foi realizado com o uso do sistema de registro eletrofisiológico RetiPort (Roland Consult, Stasche & Finger GmbH, Brandenburg a. d. Havel, Alemanha).

As respostas de eletrorretinograma foram registradas monocularmente. As pupilas foram dilatadas com uma gota do colírio tropicamida a 0,5% (Pharma Stulln GmbH, Stulln, Alemanha). Foi administrado colírio anestésico (Oxybuprocain hydrochloride 0,04%, Dr. Mann Pharma, Berlim, Alemanha) apenas quando solicitado pelo observador.

Foi utilizado como eletródio ativo um eletródio do tipo DTL, o qual foi posicionado na conjuntiva e fixado próximo aos cantos nasal e temporal do olho. Eletródios de superfície constituídos por pequenos discos de 10 mm de diâmetro folheados a ouro foram utilizados como referência e terra. Estes eletródios foram posicionados respectivamente no canto temporal ipsolateral ao olho testado e na frente (Figura 18), após a esfoliação da pele com gel abrasivo cutâneo (NuPrep, D.O. WEAVER & Company, Aurora, Colorado, EUA), com o objetivo de reduzir a resistência elétrica. Uma pasta eletrolítica (Ten20, D.O. WEAVER & Company, Aurora, Colorado, EUA) foi aplicada à face do eletródio em contato com a pele, para facilitar a condução elétrica com o mesmo. Os valores de impedância mantidos foram inferiores a 5 K $\Omega$ .



**Figura 18.** Posicionamento dos eletrodos. A: Visão Lateral. B: Visão frontal. 1: Eletrodo terra. 2. Eletrodo de referência. 3. Eletrodo ativo (DTL).

As respostas de ERG foram obtidas a partir da média entre 80 e 160 varreduras, cada uma com duração de 1 segundo. Para evitar artefatos de inicialização, o registro das respostas começou 2 segundos após o início do estímulo. Os sinais foram amplificados e filtrados com filtro passa-banda entre 1 e 300 Hz, sendo digitalizados em 1024 Hz.

### *Análise*

As respostas de amplitude ( $Amp(Fr)$ ) e fase foram extraídas do componente fundamental (1º harmônico) e analisadas com a transformada rápida de Fourier (FFT), utilizando o programa MATLAB R2011b (Mathworks, Massachusetts, EUA). A partir dos resultados da FFT, a média das amplitudes das frequências vizinhas do primeiro harmônico ( $Amp(Fr+1)$  e  $Amp(Fr-1)$ ) foram calculadas e definidas como ruído. Por exemplo, quando o eletrorretinograma é medido com a frequência temporal de 12 Hz, o ruído corresponde à média obtida entre as amplitudes de 11 e 13 Hz. Com isso, foram aceitos somente valores de amplitude com a razão entre sinal e ruído (*Signal to noise ratio*, SNR) superior a 2. A razão sinal-ruído é dada pela seguinte equação:

$$SNR = \frac{Amp(Fr)}{(Amp(Fr-1) + Amp(Fr+1)) / 2}$$

As respostas de fase obtidas com a análise de Fourier estão dentro de um intervalo de 360°. Assim, a variação da fase absoluta pode corresponder a múltiplos de 360°. Para definir as fases absolutas das respostas de observadores diferentes, assumiu-se que elas não devem variar em mais de 180°. Foi realizada a média aritmética das respostas de amplitude e fase.

Além das respostas de amplitude e fase, também foram analisadas a razão entre as respostas de amplitude (razão L/M) e a diferença entre as respostas de fase obtidas para os estímulos isolados de cones L e M.

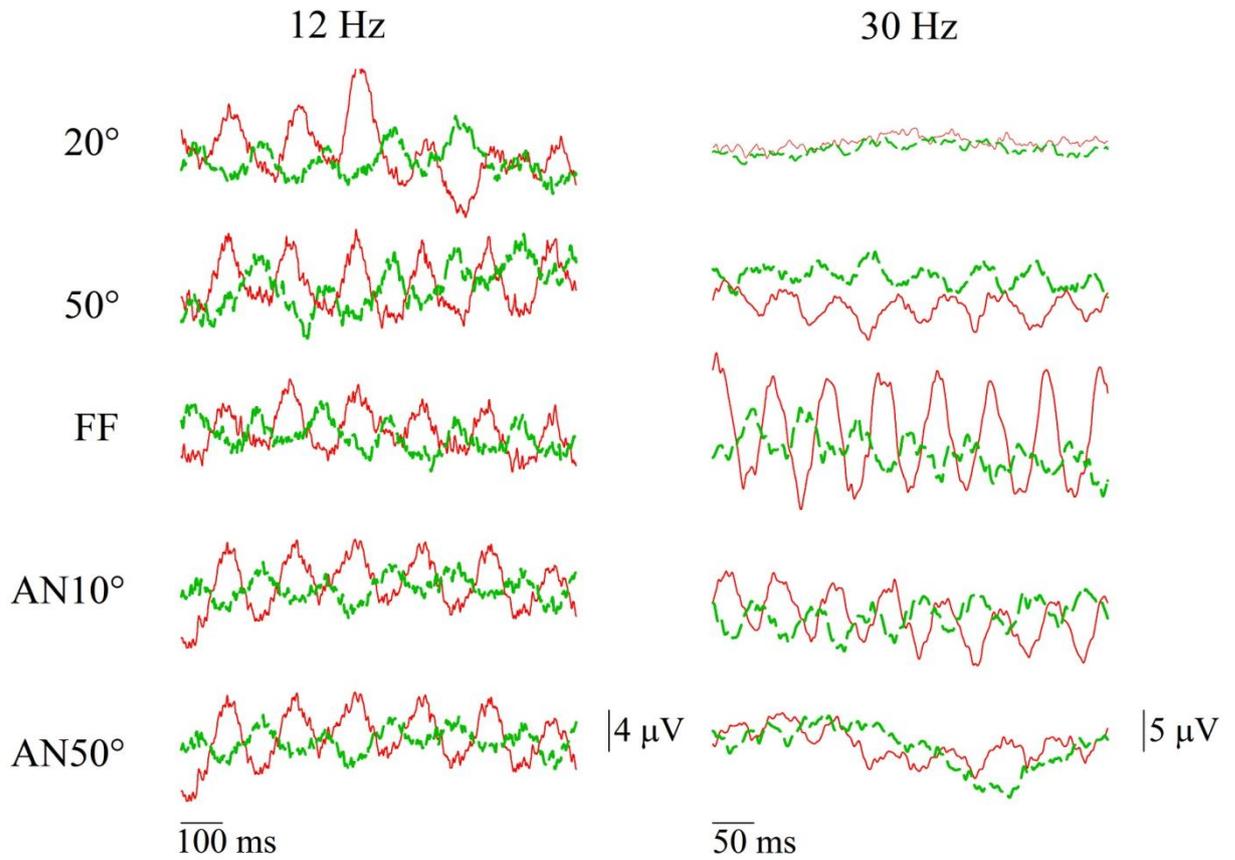
## 5. RESULTADOS

### 5.1 EXPERIMENTO 1

No experimento 1, as respostas de cones L e M ao eletrorretinograma foram medidas em cinco frequências temporais, cada uma com 14 configurações espaciais de estimulação (Figura 15).

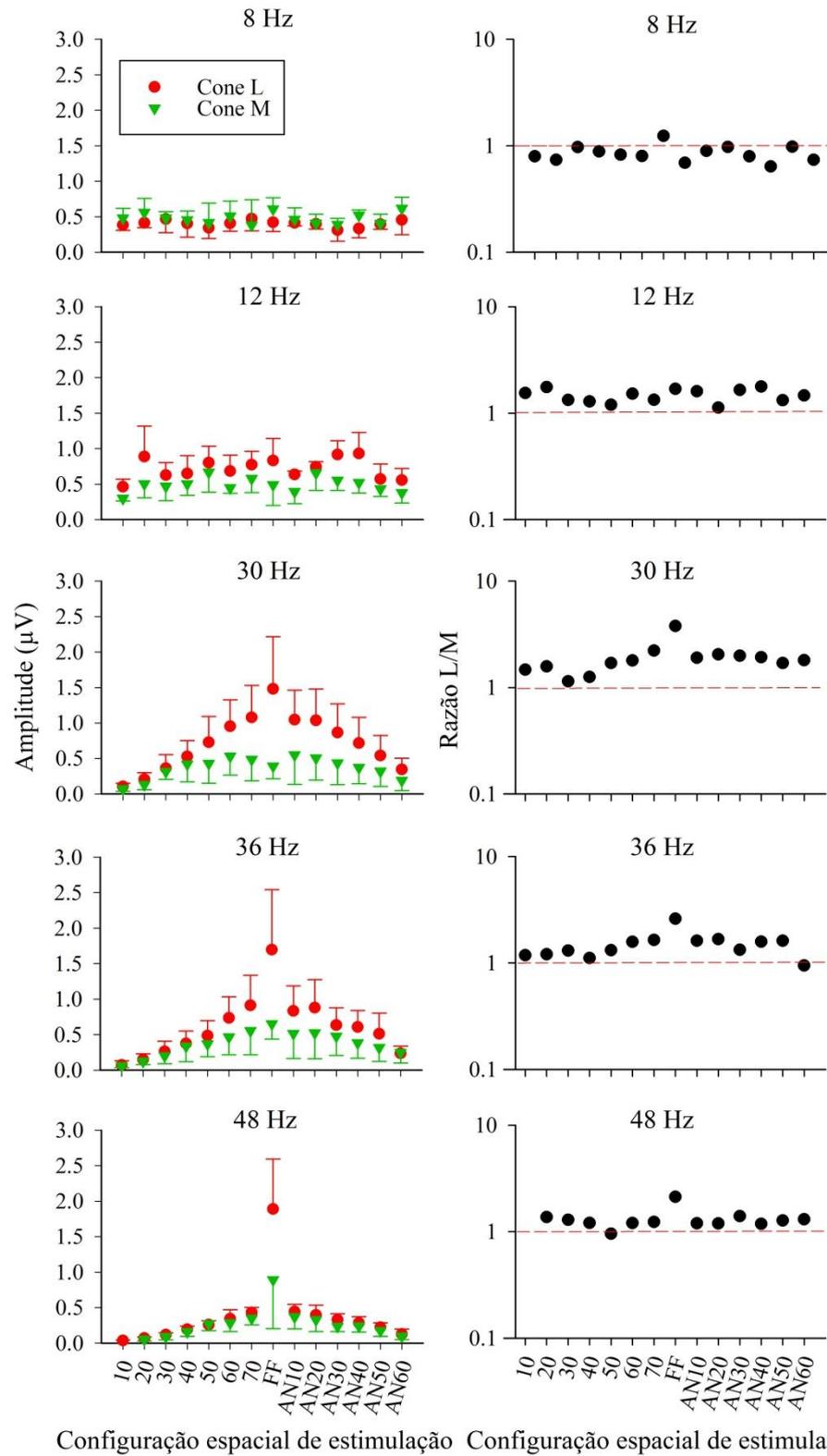
Na Figura 19, são apresentados os registros originais de apenas um sujeito, obtidos a partir das respostas isoladas de cones L e M a estímulos com frequências temporais de 12 e 30 Hz, cada um deles com contrastes de cones de 10%. A figura demonstra o tipo de resposta ao ERG medido com frequências temporais intermediárias (12 Hz) e altas (30 Hz) em um grupo representativo com cinco, do total de quatorze configurações diferentes de frequência espacial. Pode-se observar que as respostas ao estímulo de 12 Hz (coluna da esquerda) não apresentam grande variação em função da configuração espacial, como ocorre com as respostas ao estímulo de 30 Hz (coluna da direita).

Enquanto as amplitudes observadas para as respostas isoladas de cones L são maiores do que as amplitudes das respostas de cones M em frequências temporais altas (particularmente para as respostas ao *full-field* [FF]), em 12 Hz, as diferenças entre as amplitudes dos dois tipos de cone são menores. Nas respostas aos estímulos com frequências temporais de 8 Hz, praticamente não foram observadas diferenças entre as respostas de cones L e M.



**Figura 19.** Registros originais de eletrorretinograma obtidos com estímulos isolados de cones L (linhas contínuas vermelhas) e cones M (linhas tracejadas verdes), ambos com contraste de cones de 10%, medidos em um sujeito. São mostrados os registros de duas frequências temporais (12 e 30 Hz) em cinco configurações espaciais diferentes (20°, 50°, FF, AN10°, AN50°).

A média obtida entre os valores de amplitude dos quatro sujeitos que participaram do experimento e a razão de amplitude L/M obtida a partir dessas médias são apresentadas em função da configuração espacial de estimulação (Figura 20). Os dados são mostrados separadamente para cada frequência temporal de estimulação. A SNR calculada variou entre 0,5 e 16, e dependeu: do sujeito, da frequência temporal e da configuração espacial. Valores mais altos de razão sinal-ruído foram obtidos com estimulação de 30 e 36 Hz, e com a configuração do tipo *full-field* (FF). Já para a configuração espacial de 10°, na condição de isolamento de cones M com frequência temporal de 48 Hz, a razão sinal-ruído calculada estava abaixo do limite mínimo estabelecido ( $RSR \leq 2$ ) nas respostas de todos os quatro sujeitos. Por este motivo, a resposta a estas condições não foram incluídas nos resultados.



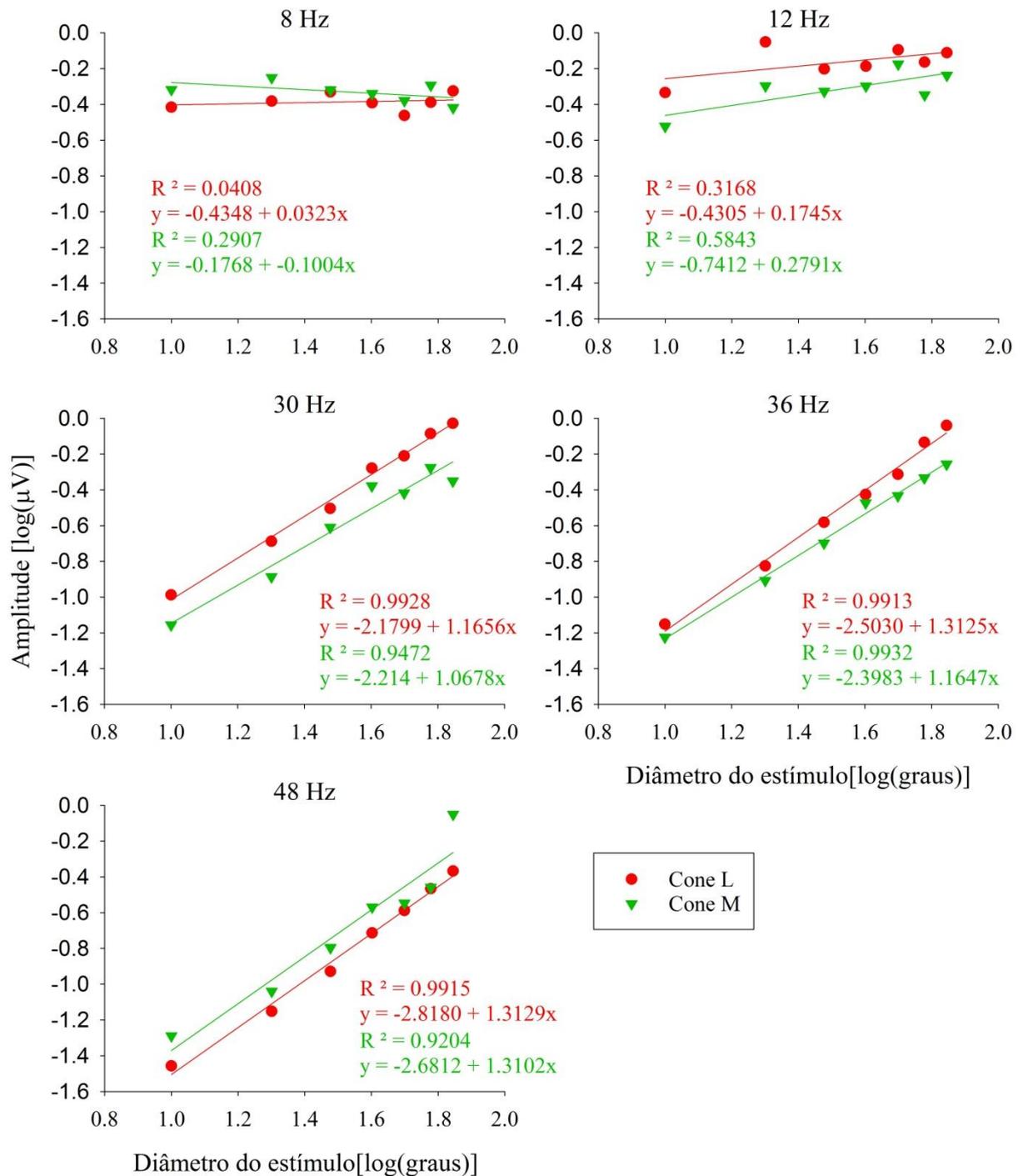
**Figura 20.** Média dos valores de amplitude (gráficos da esquerda) obtidos com o ERG para os cones L (círculos vermelhos) e M (triângulos verdes) em função da configuração de estimulação, medidos em cinco frequências temporais diferentes (escala linear). As barras de erro nos gráficos da esquerda indicam o desvio padrão. Média da razão L/M (gráficos da direita) em escala logarítmica, estimada a partir das respostas de amplitude em cada frequência temporal. As linhas vermelhas tracejadas indicam a razão L/M correspondendo à unidade.

Como observado na Figura 20, as amplitudes das respostas a estímulos com frequências temporais altas (30, 36 e 48 Hz) aumentaram de acordo com o aumento da área estimulada. Isto é, quando aumentava o diâmetro da configuração espacial de estimulação circular e reduzia o diâmetro do disco de ablação central do estímulo anelar. Deste modo, as respostas de cones L ao FF foram consideravelmente maiores do que as respostas às outras configurações espaciais. Contrastando com este resultado, as respostas de cones M ao FF exibiram um aumento relativamente pequeno em comparação às respostas obtidas com a configuração circular de 70°.

A partir de 30 Hz, as razões de amplitude L/M reduziram com o aumento da frequência temporal (Figura 20, gráficos da direita) e foram próximas à unidade em estímulos com 48 Hz, com exceção das respostas ao campo total. Por outro lado, houve redução nas razões L/M (se aproximaram da unidade) quando o ERG foi obtido com configurações espaciais menores.

Com estimulação de 8 e 12 Hz, as médias das amplitudes de resposta de cones L e M foram muito similares e não dependeram fortemente da configuração espacial de estimulação. Consequentemente, as razões L/M calculadas foram próximas à unidade para todas as configurações espaciais. Portanto, os valores de amplitudes obtidos com frequências temporais de 8 e 12 Hz, por um lado, e com frequências temporais altas pelo outro, exibem características diferentes. Estes achados estão de acordo com estudos prévios (CHALLA et al, 2010; KREMERS; LINK, 2008; PARRY et al, 2012) que sugerem que as respostas ao ERG medido com frequências temporais intermediárias e altas sejam governadas por dois mecanismos distintos.

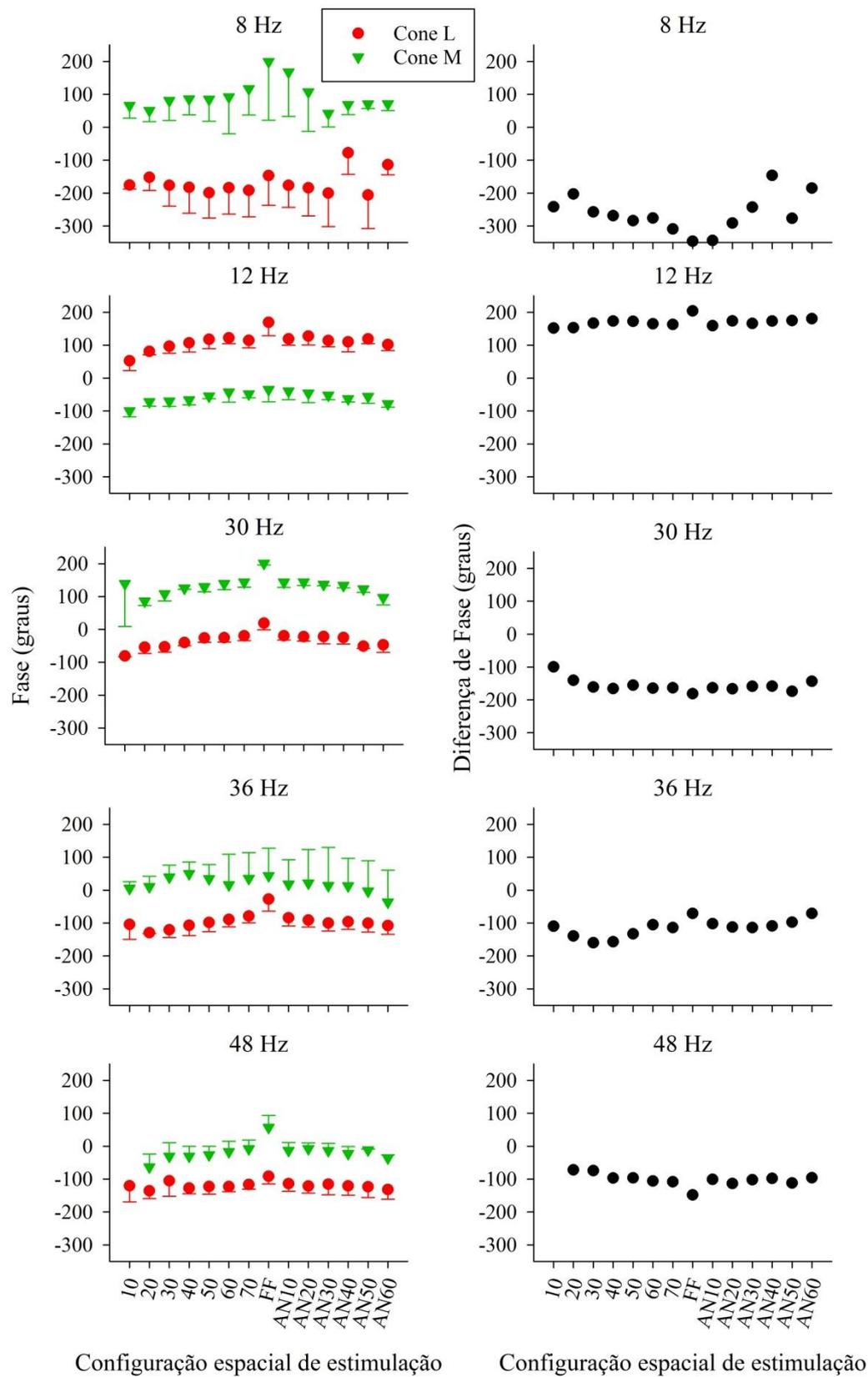
Para estudar a dependência da amplitude em relação ao tamanho do estímulo, os logaritmos das amplitudes foram dispersos em função do logaritmo do diâmetro dos estímulos circulares, excluindo as respostas ao campo total e aos estímulos anelares (Figura 21). Com estimulação de 8 e 12 Hz, as amplitudes das respostas foram relativamente constantes. Este resultado é surpreendente, pois sugere que a estimulação de apenas uma pequena área da retina foi suficiente para produzir uma resposta máxima. Nas frequências temporais altas (acima de 30 Hz), as amplitudes das respostas de cones L e M foram positivamente correlacionadas com o tamanho do estímulo. As relações entre a amplitude e o tamanho da estimulação para as respostas de cones L e M foram similares, mas não idênticas, sendo aproximadamente lineares, com valores de  $R^2$  ultrapassando 0,99. As inclinações da regressão linear foram entre 1,1 e 1,6  $\log(\mu\text{V})/\log(\text{diâmetro})$ .



**Figura 21.** Análise de regressão linear entre o logaritmo da amplitude e o logaritmo do diâmetro de configuração espacial de estimulação, para as respostas de cones L (círculos vermelhos) e M (triângulos verdes) medidos com cinco frequências temporais (8, 12, 30, 36 e 48 Hz). O coeficiente de determinação  $R^2$  (superior – cone L, inferior – cone M) e as equações da análise de regressão ( $y = ax + b$ ) (superior – cone L, inferior – cone M) são mostrados para cada regressão.

A média das respostas de fase obtidas para cada uma das cinco frequências temporais é mostrada em função da configuração espacial de estimulação, na Figura 22 (gráficos da esquerda). Pôde-se observar que a fase apresentava-se adiantada à medida que aumentava a área de estimulação, tanto em estímulos circulares, quanto em estímulos anelares. As respostas ao estímulo FF foram consideravelmente adiantadas em fase em relação às outras respostas, particularmente em frequências temporais altas.

Geralmente, as respostas de fase de cones L e M variaram de maneira similar em função da configuração de estimulação. Como resultado, as médias obtidas a partir das diferenças de fase entre as respostas destes dois tipos de cone (Figura 22, gráficos da direita) foram relativamente independentes da configuração de estimulação. Em 12 Hz, a diferença de fase foi de aproximadamente  $180^\circ$ , indicando que cones L e M estão operando de maneira oponente entre eles. No entanto, a diferença de fase torna-se menor à medida que a frequência temporal aumenta, com valores de  $170^\circ$  para o estímulo de 30 Hz e de aproximadamente  $100^\circ$  para 36 e 48 Hz. Isto sugere que as características de oponência são perdidas com o aumento da frequência temporal (Figura 22).



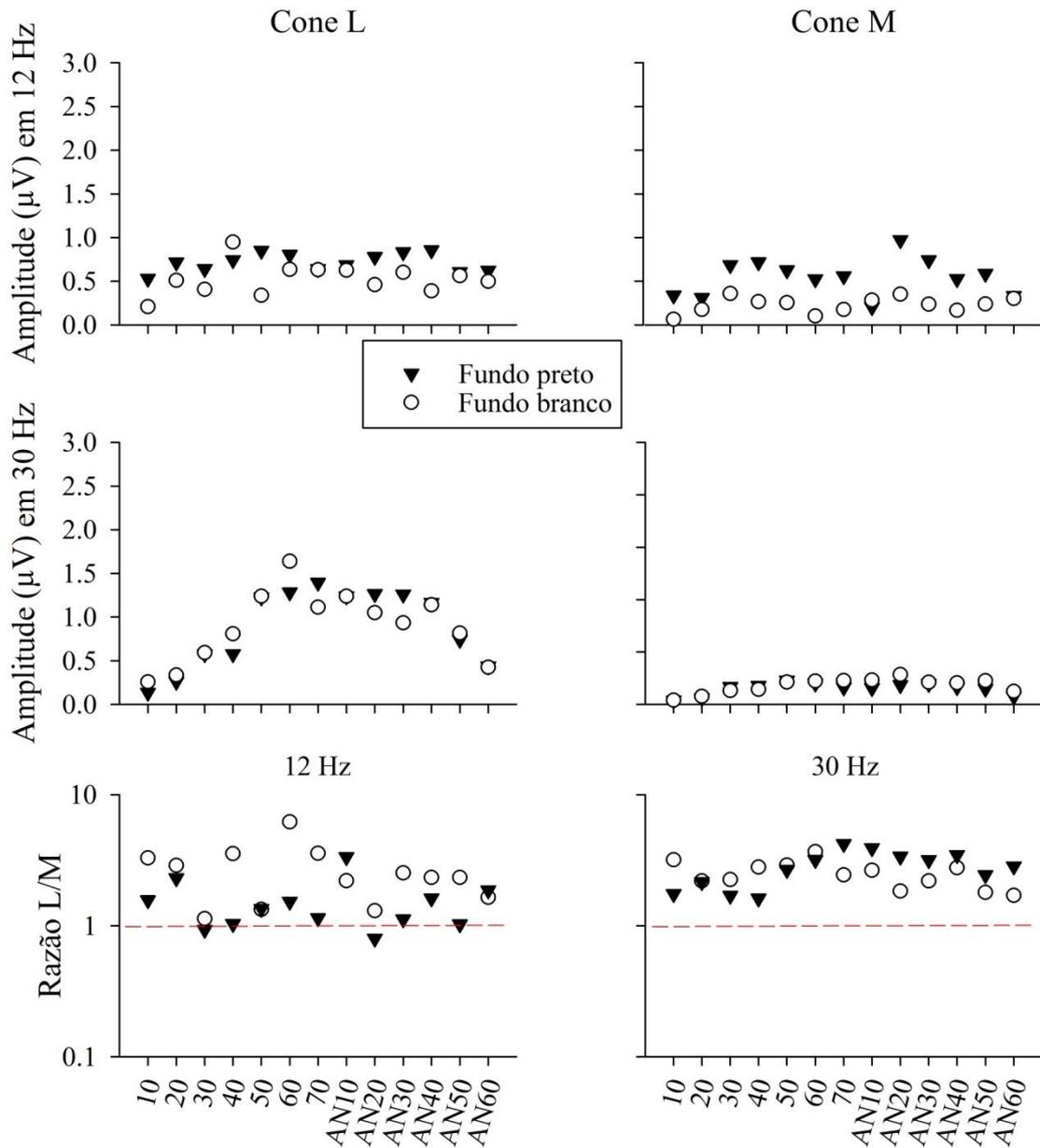
**Figura 22.** Média dos valores de fase (gráficos da esquerda) obtidos com o ERG para os cones L (círculos vermelhos) e M (triângulos verdes) em função da configuração de estimulação, medidos em cinco frequências temporais diferentes (escala linear). As barras de erro nos gráficos da esquerda indicam o desvio padrão. Os gráficos da direita correspondem à média da diferença de fase estimada a partir das respostas de fase de cones L e M em cada frequência temporal.

## 5.2 EXPERIMENTO 2

Os achados que demonstraram que as respostas de amplitude obtidas com frequências temporais intermediárias foram amplamente independentes da configuração de estimulação (Figuras 20 e 21) foram considerados surpreendentes. Em um estudo prévio (CHALLA et al, 2010), no qual o ERG foi medido com frequência temporal de 12 Hz, as respostas de amplitude eram dependentes do tamanho do estímulo, embora a razão L/M calculada para 12 e 30 Hz tenha sido similar em ambos os estudos.

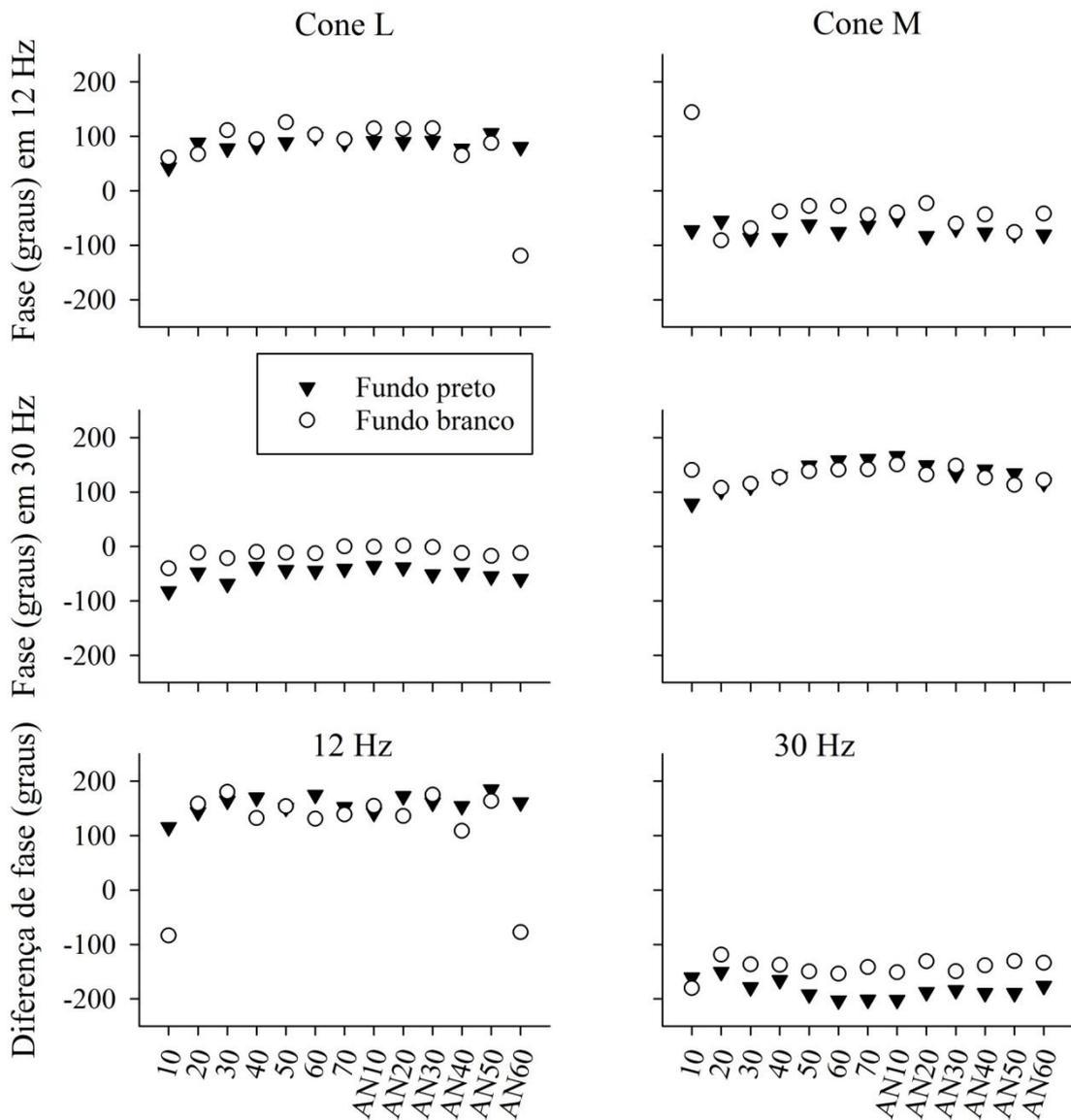
No estudo de Challa e colaboradores (2010), um monitor CRT foi utilizado como estimulador e a área que não foi estimulada apresentou a mesma luminância média do estímulo. No experimento 1, o estímulo foi bloqueado por placas de papel cartão na cor preta, e as medidas de eletrorretinograma foram realizadas em uma sala escura. Foi, portanto suposto, que talvez as respostas obtidas no experimento 1 fossem influenciadas pelo efeito de espalhamento da luz. Embora não seja esperado que esse efeito atue apenas em frequências temporais intermediárias, as medidas de eletrorretinograma foram repetidas com apenas um sujeito para 12 e 30 Hz, usando placas iluminadas de papel cartão com fundo branco para suprimir o espalhamento da luz.

A comparação entre os resultados obtidos nos dois experimentos mostrou que os valores de amplitude (Figura 23) e fase (Figura 24) de ambos dependeram de maneira similar da configuração espacial de estimulação. Além disso, os valores de amplitude obtidos com o fundo branco foram apenas ligeiramente menores do que aqueles obtidos com o fundo preto. Isto foi observado nos resultados alcançados com ambas as frequências temporais (12 e 30 Hz). Isto demonstra que o espalhamento da luz provavelmente apresentou alguma influência nas amplitudes absolutas de resposta, mas não na relação entre a amplitude e a configuração espacial do estímulo.



Configuração espacial de estimulação      Configuração espacial de estimulação

**Figura 23.** Comparação entre os valores de amplitude (escala linear) do ERG medido com fundo preto (triângulos pretos) e fundo branco (círculos brancos) em frequências temporais de 12 e 30Hz. Os gráficos da porção superior e média correspondem aos valores de amplitude dos cones L (esquerda) e M (direita). Os gráficos da porção inferior correspondem à razão L/M (escala logarítmica) estimada a partir das respostas de amplitude obtidas com 12 Hz (esquerda) e 30 Hz (direita). As linhas tracejadas indicam a razão L/M correspondendo à unidade.



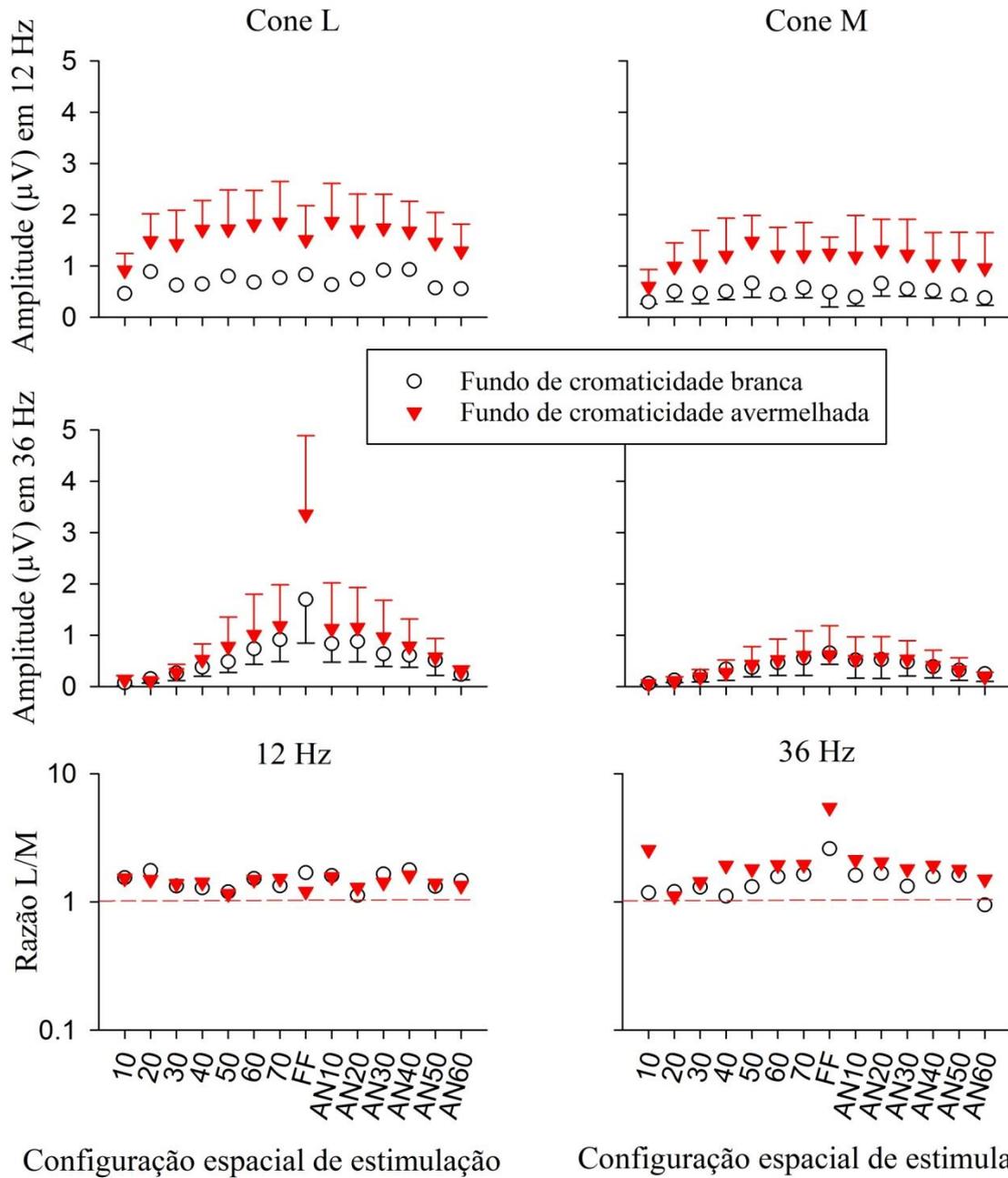
Configuração espacial de estimulação      Configuração espacial de estimulação

**Figura 24.** Comparação entre os valores de fase (escala linear) do ERG medido com fundo preto (triângulos pretos) e fundo branco (círculos brancos) em frequências temporais de 12 e 30 Hz. Os gráficos da porção superior e média correspondem aos valores de fase dos cones L (esquerda) e M (direita). Os gráficos da porção inferior correspondem à diferença de fase estimada a partir das respostas de fase de cones L e M a frequência temporal de 12 Hz (esquerda) e 30 Hz (direita).

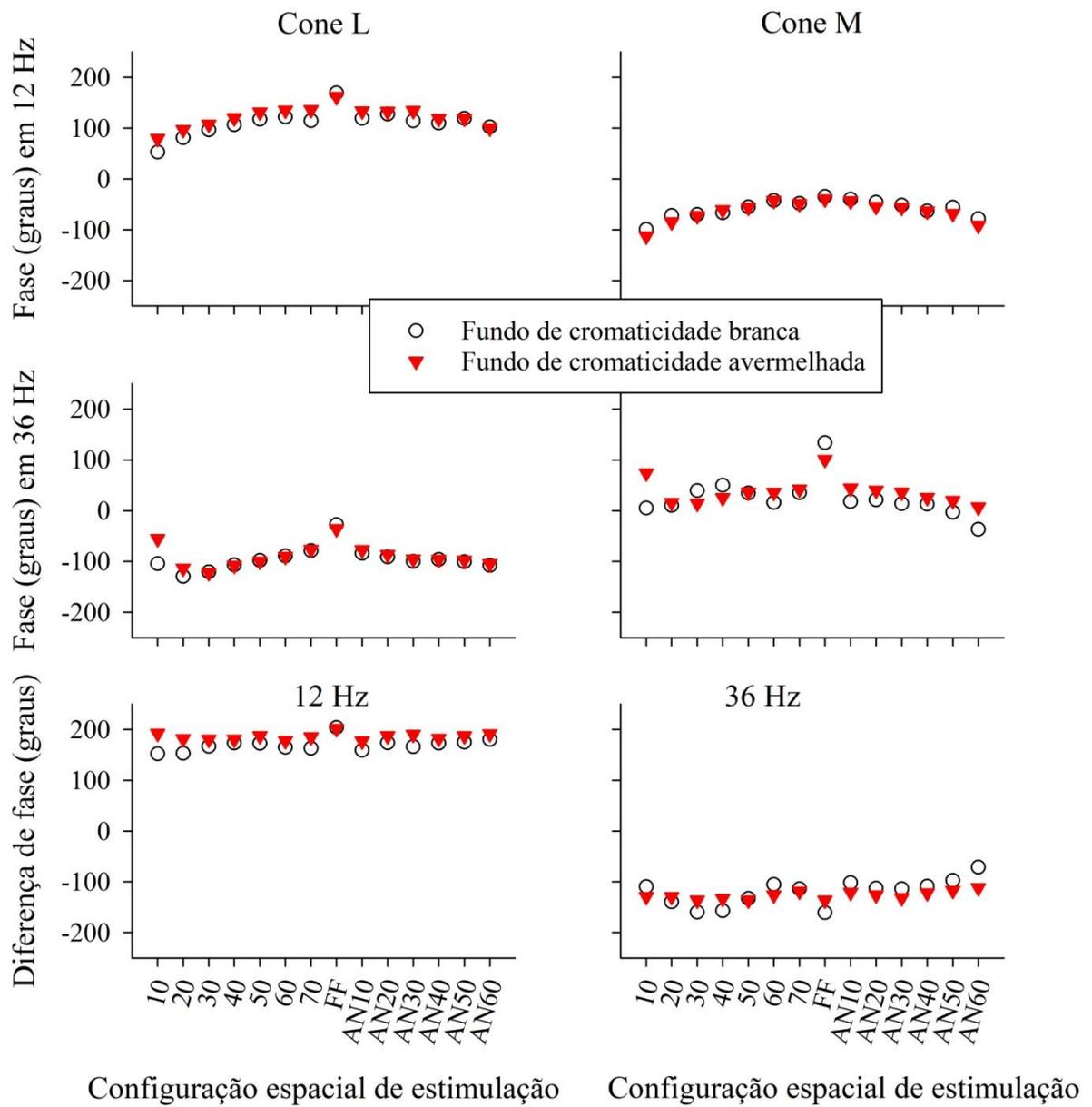
### 5.3 EXPERIMENTO 3

Este experimento foi realizado com 5 sujeitos, dos quais apenas um participou do experimento 1. Nele, foram estudados os efeitos da cromaticidade média no ERG de cones L e M, já que foi encontrado em estudos anteriores que o estado de adaptação pode influenciar fortemente os resultados (KREMERS; STEPIEN; SCHOLL; SAITO, 2003). Os experimentos foram, portanto, repetidos usando a mesma luminância média, mas variando a cromaticidade média. Isto permitiu o emprego de uma força de estimulação de maior intensidade (contraste de 18% para os estímulos que isolam cones L e M), cuja cromaticidade de fundo apresentava aspecto avermelhado, ao invés da cromaticidade de fundo branco utilizada no experimento 1.

Embora as amplitudes absolutas sejam maiores com o uso do fundo avermelhado (provavelmente devido ao contraste de cones maior), a dependência entre a amplitude e a configuração de estimulação observada entre as respostas para as duas cromaticidades de fundo foi muito similar (Figura 25). As respostas de fase (Figura 26), também foram muito similares.



**Figura 25.** Comparação entre os valores de amplitude (escala linear) do ERG medido com cromaticidade média branca (círculos brancos) e avermelhada (triângulos rosa), em frequências temporais de 12 e 36 Hz. Os gráficos da porção superior e média correspondem aos valores de amplitude dos cones L (esquerda) e M (direita). As barras de erro indicam o desvio padrão. Os gráficos da porção inferior correspondem à razão L/M estimada a partir das respostas de amplitude obtidas com 12 Hz (esquerda) e 36 Hz (direita). As linhas vermelhas tracejadas indicam a razão L/M correspondendo à unidade.



**Figura 26.** Comparação entre os valores de fase (escala linear) do ERG medido com cromaticidade média branca (círculos brancos) e avermelhada (triângulos rosa), em frequências temporais de 12 e 36 Hz. Os gráficos da porção superior e média correspondem aos valores de fase dos cones L (esquerda) e M (direita). Os gráficos da porção inferior correspondem à diferença de fase estimada a partir das respostas de fase de cones L e M obtidas com frequência temporal de 12 Hz (esquerda) e 36 Hz (direita).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 AS RESPOSTAS DE ELETORRETINOGRAMA SÃO MEDIADAS POR DOIS MECANISMOS PÓS-RECEPTORAIS SEPARADOS

Neste estudo, a estimulação com tripla substituição silenciosa foi usada para investigar as propriedades espaciais das respostas isoladas de cones L e M ao eletrorretinograma. Os resultados indicaram que, em concordância com dados prévios (KREMERS; LINK, 2008; PARRY et al, 2012), a resposta ao eletrorretinograma é governada por dois mecanismos diferentes.

Em frequências temporais altas ( $\geq 30$  Hz), as amplitudes das respostas ao ERG foram correlacionadas positivamente com a área de estimulação. As razões entre as amplitudes de cones L e M foram geralmente maiores que um, e aumentaram de acordo com o aumento da área de estimulação. Por outro lado, em frequências temporais intermediárias (8 e 12 Hz), os valores de amplitude foram aproximadamente constantes em todas as configurações de estimulação usadas no experimento 1, com valores praticamente constantes de razão L/M (próximos à unidade).

Dados prévios sugerem que o ERG medido com frequências temporais altas reflete a atividade da via de luminância. Isto também concorda com outros estudos, nos quais foram identificadas semelhanças nos resultados de razão L/M e na variabilidade individual dos participantes. Nestes estudos, foram registrados o ERG e testes psicofísicos, com frequências temporais altas e usando o método de fotometria por *flicker* heterocromático ou HFP (*Heterochromatic Flicker Photometry*, HFP). Em ambos os testes, as sensibilidades espectrais dos estímulos eram quase idênticas (função de eficiência luminosa,  $V_\lambda$ ) (JACOBS; DEEGAN, 1997; NEITZ; JACOBS, 1984).

Os dados apresentados aqui, confirmam que a média da razão L/M em resposta a estímulos com restrição espacial é aproximadamente 2. Foi proposto que o ERG medido com frequências temporais de 8 e 12 Hz reflete a atividade da via de oponência de cones L e M. As células ganglionares retinianas de oponência de cones L e M podem responder fortemente a estímulos de luminância com frequências temporais altas, particularmente nas regiões mais periféricas da retina (SOLOMON et al, 2002). No entanto, a razão L/M nas células ganglionares retinianas, comportando-se com sinais de oponência de cones L e M é aproximadamente igual à unidade (SMITH et al, 1992). Esta razão com valor aproximado a um, foi também encontrada em testes de detecção de limiares psicofísicos de *flicker*, no

entendimento de que esta detecção seja mediada pela via cromática L-M (KREMERS et al, 2000; SMITH et al, 1992). De fato, também foi encontrada no presente estudo, uma razão L/M próxima à unidade.

Além disso, a diferença de fase de aproximadamente 180° entre as respostas de cones L e M ao eletrorretinograma, sugere processamento com oponente de cones. Contudo, em frequências temporais altas, onde é proposto um mecanismo que reflete luminância, a diferença de fase encontrada também é alta. Do mesmo modo, para a diferença de fase absoluta, devem ser consideradas as latências aparentes dos sinais de cones L e M.

A latência aparente pode ser obtida a partir da inclinação da função fase *versus* frequência temporal. A amostra de frequências temporais utilizadas neste estudo é demasiadamente discretizada para estimar a latência aparente. Em estudos prévios com estímulos em FF, foi encontrado, que as latências aparentes dos sinais de ERG de cones L e M são muito pequenas em frequências temporais intermediárias, enquanto existem diferenças substanciais em frequências temporais altas (KOMMANAPALLI et al, 2014), podendo causar as grandes diferenças entre as respostas de fase no ERG de cones L e M em frequências temporais altas.

## 6.2 DEPENDÊNCIA DAS RESPOSTAS DE ELETRORRETINOGRAMA EM RELAÇÃO À CONFIGURAÇÃO ESPACIAL DE ESTIMULAÇÃO

Os dados de amplitude obtidos com estímulos de 8 e 12 Hz sugerem que um estímulo relativamente pequeno seria suficiente para produzir uma resposta máxima. Isto também foi encontrado com um sistema de registro de ERG completamente diferente e com um estimulador com quatro primárias de LED diferente do utilizado neste estudo (MAGUIRE, 2012).

No presente estudo, as amplitudes das respostas foram menores apenas para estímulos de 10° (figura 20). Estes resultados contrastam com dados de estudos prévios (CHALLA et al, 2010), no qual a amplitude variou em função da configuração espacial de estimulação. Esta discrepância não pode ser explicada pelo efeito de espalhamento da luz, como mostrado pelo experimento 2. Além disso, o efeito de espalhamento da luz também influenciaria as respostas a frequências temporais altas, o que não foi o caso. Uma possível explicação para a diferença entre os resultados obtidos em ambos os estudos, é o uso de tipos diferentes de estimulador.

Challa e colaboradores (2010) realizaram registros de ERG com estímulos com configurações espaciais diferentes, usando um monitor CRT como estimulador. Como este

tipo de estimulador é composto por um conjunto de três fósforos (vermelho, verde e azul), a modulação de cones é limitada por uma sobreposição espectral destes fósforos, e por uma luminância restrita. Estas limitações permitem apenas a técnica de dupla substituição silenciosa (MURRAY; KREMERS; PARRY, 2008). Ainda, em contraste com os estímulos fornecidos por um estimulador de LED, os estímulos apresentados em um estimulador CRT não são puramente senoidais, e incluem uma súbita elevação na excitação dos fósforos, seguidos por uma fase de decaimento, podendo conter frequências mais elevadas, que podem influenciar a resposta de ERG.

A diferença chave entre o presente estudo e o estudo de Challa e colaboradores (2010), está no comportamento da resposta de cones M. Foi mostrada aqui, uma relação constante entre as respostas de fase de cones L e M, de acordo com o aumento da configuração espacial do estímulo, ao passo que o estudo com CRT exibiu respostas de fase constantes de cones L, mas com alterações nas respostas de fase de cones M. Isto foi acompanhado por um aumento marcante da razão L/M, cujo tamanho fornece um peso maior à hipótese de cancelamento de sinal, que será discutida a seguir. Em outro estudo, isto foi estabelecido através da comparação entre as respostas obtidas com um estimulador CRT e um estimulador *Ganzfeld*, nos mesmos sujeitos (MAGUIRE, 2012).

Neste estudo, as amplitudes das respostas obtidas com frequências temporais altas dependeram do tamanho da estimulação. Nos estímulos circulares, com diâmetros entre 10° e 70°, as respostas de cones L e M aumentaram de maneira similar com o aumento do tamanho do estímulo (resultando em uma razão L/M constante). Este aumento pôde ser descrito por uma função exponencial, com expoentes variando entre 1,1 e 1,3 (Figura 21).

Se a retina fosse completamente homogênea, e cada parte da mesma contribuísse de maneira equilibrada para a resposta de ERG, poderia ser esperado que os valores de amplitude fossem proporcionais à área de estimulação, com o quadrado do diâmetro, no qual, uma inclinação com valor igual a dois poderia ser esperada. Uma inclinação menor sugere a presença de mudanças na densidade de cones dependente da excentricidade retiniana. Possivelmente, outros fatores também poderiam contribuir para esta inclinação menor, como a convergência de cones para as células bipolares.

Para estímulos maiores que 70° (excentricidades além de 35°), as respostas de ERG de cones L e M a frequências temporais altas apresentaram características diferentes: enquanto as respostas de cones M aos estímulos *full-field* (FF) e de 70° apresentaram valores similares de amplitude, as amplitudes das respostas de cones L foram substancialmente maiores para os

estímulos *full-field* (FF). Estes achados sugerem que além de 35° de excentricidade, as respostas de ERG são geradas em maior parte pela atividade de cones L.

Os resultados descritos no parágrafo anterior concordam com achados de outros estudos, nos quais foram analisados dados de ERG multifocal (KUCHENBECKER et al, 2008) e com expressão de mRNA dependente da excentricidade (HAGSTROM; NEITZ J; NEITZ M, 1998, 2000). Estes estudos sugeriram que a porção mais periférica da retina é composta quase exclusivamente por cones L. No entanto, em 48 Hz, as respostas de cones M ao ERG de campo total foram maiores do que as respostas obtidas com outras configurações espaciais de estimulação, indicando que os cones M não estão completamente ausentes na periferia da retina.

### 6.3 INTERAÇÕES COMPLEXAS DE SINAIS EM FREQUÊNCIAS TEMPORAIS ALTAS

Três aspectos dos dados apresentados neste estudo mostram que, mesmo dentro do intervalo de frequências temporais altas há uma influência complexa sobre as respostas de ERG (Figura 20). Em primeiro lugar, as razões L/M para todas as configurações espaciais de estimulação, exceto para o campo total, reduziram de aproximadamente dois, em 30 Hz, para ligeiramente mais do que um, em 48 Hz.

Em segundo lugar, as diferenças entre as respostas ao *full-field* e as respostas às outras configurações espaciais de estimulação aumentaram em função da frequência temporal: a resposta de cones L ao *full-field* em 30 Hz foi aproximadamente 1,5 vezes maior do que a resposta ao estímulo de 70°, enquanto em 48 Hz, esta razão foi de aproximadamente 4. Já a resposta de cones M ao ERG *full-field* em 30 Hz, foi ligeiramente menor do que a resposta ao estímulo de 70°. Em 48 Hz, essa resposta foi mais do que duas vezes maior para o *full-field* em comparação com o estímulo de 70° (Figura 20). Estes resultados indicam que as respostas de cones na porção mais periférica da retina podem ter propriedades temporais diferentes quando comparadas à retina central.

Nas respostas ao ERG *full-field*, a soma entre os vetores destas respostas pode levar a interações complicadas. Por exemplo, em 30 Hz, se as diferenças de fase das respostas de cones M na retina central e periférica, medidas separadamente, forem maiores do que 90°, a resposta combinada (FF) entre centro e periferia pode ser menor do que a resposta ao estímulo de 70°, devido à presença de interações destrutivas. Possivelmente, quando medidas separadamente, as diferenças de fase das respostas são menores do que 90° em frequências temporais altas, de modo que a interação seja aditiva nessas frequências temporais.

Em terceiro lugar, a configuração espacial de estimulação e a frequência temporal possuem um efeito nas diferenças de fase entre as respostas de cones L e cones M para estímulos diferentes (figura 22, gráficos da direita). Provavelmente, esses três efeitos são causados pelo mesmo mecanismo. Para testar esta proposição são necessários dados mais detalhados, medidos em frequências temporais adicionais e mais configurações espaciais de estimulação.

## 7. CONCLUSÃO

A análise dos valores de amplitude e razão L/M das respostas eletrorretinográficas em frequências temporais intermediárias (8 e 12 Hz) e altas (30, 36 e 48 Hz) sugere que o ERG medido nestas frequências temporais seja gerado por mecanismos pós-receptoriais separados. Estímulos com frequência temporal alta geram razão L/M maior que um, aumentando de acordo com a área de estimulação. Estas características são semelhantes às propriedades da via de processamento de luminância.

Já as respostas eletrorretinográficas a estímulos com frequências temporais intermediárias apresentaram razão L/M próxima à unidade e diferença de fase de 180°. Estas respostas indicam processamento com oposição entre os sinais de cone-L e cone-M, característica da via cromática.

As respostas eletrorretinográficas obtidas com estimulação em frequências temporais intermediárias não dependem da configuração espacial de estimulação. Sugere-se que a estimulação com estas frequências temporais gerem respostas máximas mesmo quando pequenas áreas retinianas são estimuladas.

As amplitudes das respostas eletrorretinográficas geradas com estímulos em frequências temporais altas depende da configuração espacial, ou seja, quanto maior o tamanho do estímulo, maior será a amplitude das respostas de cones L e cones M. As amplitudes das respostas de cones-L, além de 35° de excentricidade retiniana excedem as amplitudes de cones M, sugerindo que nas porções mais periféricas da retina as respostas de ERG são geradas predominantemente por cones L, porém sem excluir a participação de cones-M.

A estimulação com frequências temporais altas gera uma interação complexa entre os sinais eletrorretinográficos de cones-L e cones-M. Os resultados indicam que as respostas de cones na porção mais periférica da retina podem ter propriedades temporais diferentes quando comparadas à retina central.

Portanto, com a utilização do método de tripla substituição silenciosa, é possível estudar as propriedades espaciais dos sinais de cones L e M dentro das respostas de ERG. Os dados confirmam que as respostas de ERG podem refletir a atividade de duas vias pós-receptorais diferentes.

## 8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Os resultados obtidos a partir deste trabalho foram apresentados em congresso internacional. O pôster intitulado “**The influence of stimulus size on L- and M-cone driven electroretinograms**” foi apresentado no encontro anual da associação para pesquisa em visão e oftalmologia (The Association for research on vision and Ophtalmology – ARVO 2014 – Annual Meeting), o qual foi realizado no período de 04 a 08 de maio de 2014, em Orlando, Flórida, Estados Unidos. O resumo publicado nos anais do evento pode ser observado no anexo 1.

A partir dos resultados deste estudo, também foi gerado o artigo intitulado “**The Spatial Properties of L- and M-Cone Inputs to Electroretinograms that Reflect Different Types of Post-Receptor Processing**”. O artigo foi publicado no periódico indexado “PLOS ONE”, o qual possui fator de impacto *Journal citation report* (JCR) igual a 3.534, correspondendo à Qualis A2 da CAPES. O artigo pode ser observado no anexo 2.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAYLOR DA, LAMB TD, YAU KW. The membrane current of single rod outer segments. **Journal of Physiology**, 288: 589-611, 1979.
- BEAR, MF, CONNORS BW, PARADISO MA. **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso**. 2ª ed. Porto Alegre: ArtMed, 2002.
- BERNTSON A, TAYLOR WR. Response characteristics and receptive field widths of on-bipolar cells in the mouse retina. **Journal of Physiology**, 524: 879-889, 2000.
- BEREZOVSKY A. Validation of a new fiber electrode prototype for clinical electroretinography. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 71: 316-320, 2008.
- BIRCH DG, ANDERSON JL. Standardized full-field electroretinography: normal values and their variation with age. **Archives of Ophthalmology**, 110: 1571-1576, 1992.
- BOYCOTT BB, WÄSSLE H. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. **Journal of Physiology**, 240: 397-419, 1974.
- BRAINARD DH, ROORDA A, YAMAUCHI Y, CALDERONE JB, METHA AB, NEITZ J, NEITZ M, WILLIAMS DR, JACOBS GH. Functional consequences of the relative numbers of L and M cones. **Journal of the Optical Society of America A**, 17: 607-614, 2000.
- BURNS ME, MENDEZ A, CHEN J, BAYLOR DA. Dynamics of cyclic GMP synthesis in retinal rods. **Neuron**, 36: 81-91, 2002.
- BUSH RA, SIEVING PA. A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-Wave. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 35: 635-645, 1994.
- BUSH RA, SIEVING PA. Inner retinal contributions to the primate photopic fast flicker electroretinogram. **Journal of the Optical Society of America A**, 13: 557-565, 1996.
- CARROL J, NEITZ J, NEITZ M. Estimates of L:M cone ratio from ERG flicker photometry and genetics. **Journal of Vision**, 2: 531-542, 2002.
- CHALLA NK, MCKEEFRY D, PARRY NRA, KREMERS J, MURRAY IJ, PANOURGIAS A. L- and M-cone input to 12Hz and 30Hz flicker ERGs across the human retina. **Ophthalmic and Physiological Optics**, 30: 503-510, 2010.
- CHEN L, YANG P, KIJLSTRA A. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. **Ocular Immunology and Inflammation**, 10:27-39, 2002.
- CRONER LJ, KAPLAN E. Receptive fields of p and m ganglion cells across the primate retina. **Vision Research**, 35: 7-24, 1995.
- CURCIO CA, SLOAN JR KR, PACKER O, HENDRICKSON AE, KALINA RE. Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry. **Science**, 236:579-582, 1987.

DACEY DM. Circuitry for color coding in the primate retina. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93: 582–588, 1996.

DACEY DM. Parallel pathways for spectral coding in primate retina. **Annual Review of Neuroscience**, 23: 743–775, 2000.

DACEY DM. Primate retina: cell types, circuits and color opponency. **Progress in Retinal and Eye Research**, 18: 737-763, 1999.

DACEY DM, LEE BB. The “blue-on” opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. **Nature**, 367: 731-7735, 1994.

DACEY DM, PACKER OS. Colour coding in the primate retina: diverse cell types and cone-specific circuitry. **Current Opinion in Neurobiology**, 13:421–427, 2003.

DACEY DM, PACKER OS, DILLER L, BRAINARD D, PETERSON B, LEE B. Center surround receptive field structure of cone bipolar cells in primate retina. **Vision Research**, 40: 1801–1811, 2000.

DACEY DM, PETERSEN M. Dendritic field size and morphology of midget and parasol ganglion cells of the human retina. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 89: 9666-9670, 1992.

DAWSON WW, TRICK GL, LITZKOW CA. Improved Electrode for Electroretinography. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 18: 988-991, 1979.

DE MONASTERIO FM, GOURAS P, TOLHURST DJ. Trichromatic Colour Opponency in Ganglion Cells of the Rhesus Monkey Retina. **Journal of Physiology**, 251: 197-216, 1975.

DHINGRA A, VARDI N. mGlu receptors in the retina. **WIREs Membrane Transport and Signaling**, 1:641–653, 2012.

DONNER K, RUSHTON WA H. Retinal stimulation by light substitution. **Journal of Physiology**, 149: 288-302, 1959.

DOS REIS JW, DE CARVALHO WA, SAITO CA, SILVEIRA LCL. Morphology of horizontal cells in the retina of the capuchin monkey, *cebus apella*: how many horizontal cell classes are found in dichromatic primates? **The journal of comparative neurology**, 443: 105–123, 2002.

DOS SANTOS SN, DOS REIS JW, DA SILVA FILHO M, KREMERS J, SILVEIRA LCL. Horizontal cell morphology in nocturnal and diurnal primates: a comparison between owl-monkey (*Aotus*) and capuchin monkey (*Cebus*). **Visual neuroscience**, 22: 405–415, 2005.

ESTÉVEZ O, SPEKREIJSE H. A spectral compensation method for determining the flicker characteristics of the human colour mechanisms. **Vision Research**, 14: 823-830, 1974.

ESTÉVEZ O, SPEKREIJSE H The "silent substitution" method in visual research. **Vision Research**, 22: 681-691, 1982.

FIELD GD, SHER A, GAUTHIER JL, GRESCHNER M, SHLENS J, LITKE AM, CHICHILNISKY EJ. Spatial properties and functional organization of small bistratified ganglion cells in primate retina. **The Journal of Neuroscience**, 27: 13261–13272, 2007.

FRISHMAN, LJ, SIEVING PA. Evidence for two sites of adaptation affecting the dark-adapted erg of cats and primates. **Vision Research**, 35: 435-442, 1995.

GARGINI C, DEMONTIS GC, CERVETTO L, BISTI S. Analysis of pharmacologically isolated components of the ERG. **Vision Research**, v. 39, p. 1759-1766, 1999.

GOURAS P. Identification of cone mechanisms in monkey ganglion cells. **Journal of Physiology**, 199: 533-547, 1968.

GUYTON AC, HALL JE. **Textbook of medical physiology**. 11<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006

HAGSTROM SA, NEITZ J, NEITZ M. Variations in cone populations for red-green color vision examined by analysis of mRNA. **Neuroreport**, 9: 1963-67, 1998.

HAGSTROM SA, NEITZ J, NEITZ M. Cone pigment gene expression in individual photoreceptors and the chromatic topography of the retina **Journal of the Optical Society of America A**, 17: 527-537, 2000.

HECKENLIVELY JR, ARDEN GB. **Principles and practice of clinical electrophysiology of vision**. 2<sup>a</sup> ed. Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology, 2006.

HERR S, KLUG K, STERLING P, SCHEIN S. Inner S-cone bipolar cells provide all of the central elements for s cones in macaque retina. **The Journal Of Comparative Neurology**, 457:185–201, 2003.

HOFER H, CARROLL J, NEITZ J, NEITZ M, WILLIAMS DR. Organization of the human trichromatic cone mosaic. **Journal of Neuroscience**, 25: 9669-9679, 2005.

HOLDER GE, CELESIA GG, MIYAKE Y, TOBIMATSU S, WELEBER RG. International federation of clinical neurophysiology: recommendations for visual system testing. **Clinical Neurophysiology**, 121: 1393–1409, 2010.

ISHIHARA M. Versuch einer deutung der photoelektrischen schwankungen am froschaue. **Pflugers Archiv fur die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, 124: 569-618, 1906.

JACOBS GH, DEEGAN JF. Spectral sensitivity of macaque monkeys measured with ERG flicker photometry. **Visual Neuroscience**, 14: 921–928, 1997.

JOHNSON PT, WILLIAMS RR, REESE BE. Developmental patterns of protein expression in photoreceptors implicate distinct environmental *versus* cell-intrinsic mechanisms. **Visual Neuroscience**, 18: 157–168, 2001.

JOSELEVITCH C. Human retinal circuitry and physiology. **Psychology & Neuroscience**, 1: 141-165, 2008.

KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM. **Principles of neural science**. 4<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

KAPLAN E, SHAPLEY RM. The primate retina contains two types of ganglion cells, with high and low contrast sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 83: 2755-2757, 1986

KOMMANAPALLI D, MURRAY IJ, KREMERS J, PARRY NR, MCKEEFRY DJ. Temporal characteristics of L- and M cone isolating steady-state electroretinograms. **Journal of the Optical Society of America A**, 31: A113–A120, 2014.

KREMERS J. The assessment of L- and M-cone specific electroretinographical signals in the normal and abnormal retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, 22: 579-605, 2003.

KREMERS J, CZOP D, LINK B. Rod and S-cone driven ERG signals at high retinal illuminances. **Documenta Ophthalmologica**, 118: 205-216, 2009.

KREMERS J, LINK B. Electroretinographic responses that may reflect activity of parvo- and magnocellular post-receptoral visual pathways. **Journal of Vision**, 8: 1-14, 2008.

KREMERS J, MEIERKORD S. Rod–cone-interactions in deuteranopic observers: models and dynamics. **Vision Research**, 39: 3372–3385, 1999.

KREMERS J, PANGENI G. Electroretinographic responses to photoreceptor specific sine wave modulation. **Journal of the Optical Society of America A**, 29: A309-A316, 2012.

KREMERS J, RODRIGUES AR, SILVEIRA LCL, SILVA FILHO M. Flicker ERGs representing chromaticity and luminance signals. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 51: 577-587, 2010.

KREMERS J, SCHOLL HPN, KNAU H, BERENDSCHOT TTJM, USUI T, SHARPE LT. L/M cone ratios in human trichromats assessed by psychophysics, electroretinography, and retinal densitometry. **Journal of the Optical Society of America A**, 17: 517-526, 2000.

KREMERS J, STEPIEN MW, SCHOLL HPN, SAITO CA. Cone selective adaptation influences L- and M-cone driven signals in electroretinography and psychophysics. **Journal of Vision**, 3: 146–160, 2003.

KREMERS J, USUI T, SCHOLL HPN, SHARPE LT. Cone signal contributions to electrograms in dichromats and trichromats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 40: 920-930, 1999.

KUCHENBECKER JA, SAHAY M, TAIT DM, NEITZ M, NEITZ J. Topography of the long- to middle-wavelength sensitive cone ratio in the human retina assessed with a wide-field color multifocal electroretinogram. **Visual Neuroscience**, 25: 301-6, 2008.

LAMB TD, PUGH JR EN. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. **Progress in Retinal and Eye Research**, 23: 307–380, 2004.

LAMB TD, PUGH JR EN. Phototransduction, Dark adaptation, and rhodopsin regeneration - the proctor lecture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 47: 5138–5152, 2006.

LAVAIL MM. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. **Science**, 174: 1071-1073, 1976.

LEE BB, DACEY DM, SMITH VC, POKORNY J. Horizontal cells reveal cone type-specific adaptation in primate retina. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96: 14611–14616, 1999.

LEE BB, KREMERS J, YEH T. Receptive fields of primate retinal ganglion cells studies with a novel technique. **Visual Neuroscience**, 15: 161–175, 1998.

LEE BB, MARTIN PR, GRÜNERT U. Retinal connectivity and primate vision. **Progress in Retinal and Eye Research**, 29: 622-639, 2010.

LEE BB, MARTIN PR, VALBERG A. Sensitivity of macaque retinal ganglion cells to chromatic and luminance flicker. **Journal of Physiology**, 414: 223-243, 1989.

LEE BB, POKORNY J, SMITH VC, MARTIN PR, VALBERG A. Luminance and chromatic modulation sensitivity of macaque ganglion cells and human observers. **Journal of the Optical Society of America A**, 7: 2223-2236, 1990.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios?** Conceitos fundamentais de neurociências. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

MAGUIRE J. **University of Manchester** : The variation in cone isolating ergs across the retina in a normal population and patients diagnosed with retinitis pigmentosa, 2012. MSc Thesis (Master's Degree in Investigative Ophthalmology and Vision Science) - University of Manchester, Manchester, 2012.

MARCUS M, CABAEL L, MARMOR M. Utility in clinical practice of standard vs. high-intensity ERG a-waves. **Documenta Ophthalmologica**, 113: 145–153, 2006.

MARMOR MF, FULTON AB, HOLDER GE, MIYAKE Y, BRIGELL M, BACH M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). **Documenta Ophthalmologica**, 118: 69-77, 2009.

MARTIN PR, LEE BB, WHITE AJ, SOLOMON SG, RUTTIGER L. Chromatic sensitivity of ganglion cells in the peripheral primate retina. **Nature**, 410: 933–936, 2001.

MASLAND RH. The fundamental plan of the retina. **Nature Neuroscience**, 4: 877-886, 2001.

MASSEY SC, MILLER RF. Glutamate receptors of ganglion cells in the rabbit retina: evidence for glutamate as a bipolar cell transmitter. **Journal of Physiology**, 405: 635-655, 1988.

MCKEEFRY D, KREMERS J, KOMMANAPALLI D, CHALLA NK, MURRAY IJ, MAGUIRE J, PARRY N. Incremental and decremental L- and M-cone-driven ERG

responses: I. Square-wave pulse stimulation. **Journal of the Optical Society of America A**, 31: A159-169, 2014.

MIURA G, WANG MH, IVERS KM, FRISHMAN LJ. Retinal pathway origins of the pattern ERG of the mouse. **Experimental Eye Research**, 89: 49–62, 2009.

MULLEN KT, KINGDOM FAA. Losses in peripheral colour sensitivity predicted from ‘hit and miss’ post-receptoral cone connections. **Vision Research**, 36: 1995–2000, 1996.

MURRAY IJ, KREMERS J, PARRY NRA. L- and M-Cone isolating ergs: LED versus CRT stimulation. **Visual Neuroscience**, 25: 327–331, 2008.

MURRAY IJ, PARRY NRA, KREMERS J, STEPIEN MW, SCHILD A. Photoreceptor topography and cone specific electroretinograms. **Visual Neuroscience**, 21: 231-235, 2004.

NATHANS J, THOMAS D, HOGNESS DS. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. **Science**, 232: 193-202, 1986.

NATHANS J. The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. **Neuron**, 24: 299-312, 1999.

NEITZ J, CARROL J, YAMAUCHI Y, NEITZ M, WILLIAMS DR. Color perception is mediated by a plastic neural mechanism that is adjustable in adults. **Neuron**, 35: 783–792, 2002.

NEITZ J, JACOBS GH. Electroretinogram measurements of cone spectral sensitivity in dichromatic monkeys. **Journal of the Optical Society of America A**, 1: 1175–1180, 1984.

PARANHOS FRL, PARANHOS JR A, NEHEMY MB. Eletroretinograma: considerações a respeito dos limites de normalidade e comparação entre valores normais de dois diferentes laboratórios. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 65: 213-206, 2002.

PARRY NR, MURRAY IJ, PANORGIAS A, MCKEEFRY DJ, LEE BB, KREMERS J. Simultaneous chromatic and luminance human electroretinogram responses. **Journal of Physiology**, 590: 3141-54, 2012.

PEREIRA, JM, MENDIETA L, SACAI PY, SALOMÃO SR, BEREZOVSKY A. Estudo normativo do eletroretinograma de campo total em adultos jovens. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 66: 137-144, 2003.

PUGH JR EN, LAMB TD. Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanisms and amplification, recovery and light adaptation. **Handbook of Biological Physics**. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 2000.

PURVES, D. **Neuroscience**. 3ª ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2004

QIU H, FUJIWARA E, LIU M, LAM BL, HAMASAKI DI. Evidence that a-wave latency of the electroretinogram is determined solely by photoreceptors. **Japanese Journal of Ophthalmology**, 46: 426–432, 2002.

- RAMÍREZ JM, TRIVIÑO A, RAMÍREZ AI, SALAZAR JJ, GARCÍA-SÁNCHEZ J. Structural specializations of human retinal glial cells. **Vision Research**, 36: 2029-2036, 1996.
- REICHENBACH A, BRINGMANN A. New functions of müller cells. **Glia**, 61:651–678, 2013.
- REID RC. Vision. In: SQUIRE LR, BLOOM FE, McCONNELL SK, ROBERTS JL, SPITZER NC, ZIGMOND MJ. **Fundamental Neuroscience**. 2<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2003.
- REID, R.C.; SHAPLEY, R.M. Space and time maps of cone photoreceptor signals in macaque lateral geniculate nucleus. **Journal of Neuroscience**, 22: 6158–6175, 2002.
- ROORDA A, METHA AB, LENNIE P, WILLIAMS DR. Packing arrangement of the three cone classes in primate retina. **Vision Research**, 41: 1291–1306, 2001.
- ROORDA A, WILLIAMS DR. The arrangement of the three cone classes in the living human eye. **Nature**, 397: 520-522, 1999.
- RUSHTON WAH. Pigments and signals in colour vision. **Journal of Physiology**, 220:1-31, 1972.
- SANES JR, ZIPURSKY SL. Design principles of insect and vertebrate visual systems. **Neuron**, 66: 15-36, 2010.
- SCHOLL HPN, KREMERS J. Alterations of L- and M-cone driven ERGs in cone and cone-rod dystrophies. **Vision Research**, 43: 2333-2344, 2003.
- SCHOLL HPN, KREMERS J, WISSINGER B. Macular dystrophy with protan genotype and phenotype studied with cone type specific ERGs. **Current Eye Research**, 22: 221-228, 2001.
- SHAPIRO AG, POKORNY J, SMITH VC. Cone-rod receptor spaces with illustrations that use the CRT phosphor and light-emitting-diode spectra. **Journal of the Optical Society of America A**, 13: 2319-28, 1996.
- SILVEIRA LCL, SAITO CA, LEE BB, KREMERS J, DA SILVA FILHO M, KILAVIK BE, YAMADA ES, PERRY VH. Morphology and physiology of primate M and P cells. **Progress in Brain Research**, 144: 21-46, 2004.
- SLAUGHTER MM, MILLER RF. An excitatory amino acid antagonist blocks cone input to sign-conserving second-order retinal neurons. **Science**, 219: 1230-1232, 1983.
- SMITH VC, LEE BB, POKORNY J, MARTIN PR, VALBERG A. Responses of macaque ganglion cells to the relative phase of heterochromatically modulated lights. **Journal of Physiology**, 458: 191–221, 1992.
- SOLOMON SG, LENNIE P. The machinery of colour vision. **Nature Reviews Neuroscience**, 8: 276-286, 2007.

SOLOMON SG, MARTIN PR, WHITE AJR, RÜTTIGER L, LEE BB. Modulation sensitivity of ganglion cells in peripheral retina of macaque. **Vision Research**, 42: 2893–2898, 2002.

STRAUSS O. The retinal pigment epithelium in visual function. **Physiological Reviews**, 85: 845–881, 2005.

SZMAJDA BA, GRÜNERT, MARTIN P. Retinal ganglion cell inputs to the koniocellular pathway. **The Journal of Comparative Neurology**, 510: 251–268, 2008.

TORRE V, MATTHEWS HR, LAMB, TD. Role of calcium in regulating the cyclic GMP cascade of phototransduction in retinal rods. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 83: 7109-7113, 1986.

TOVÉE MJ. **An introduction to the visual system**. 2<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

WÄSSLE H. Parallel processing in the mammalian retina. **Nature Reviews Neuroscience**, 5: 1-11, 2005.

WOLPERT K; TSANG S. Electroretinography. In: BELUSIC G. **Electroretinograms**. Rijeka, Croatia: In Tech, 2011.

YAU KW. Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 35:9-32, 1994.

YIN H, PARDUE MT. Performance of the DTL electrode compared to the Jet contact lens electrode in clinical testing. **Documenta Ophthalmologica**, 108: 77–86, 2004.

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE 1 – FICHA DE ANAMNESE**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**  
**LABORATÓRIO DE NEUROLOGIA TROPICAL**  
**Av. Generalíssimo Deodoro, 92 – Umarizal – Belém/PA**

**Anamnese**

Data:

**1 Identificação**

Nome:

Sexo: F( ) M( )

Idade:

Fone:

Endereço residencial:

Escolaridade:

Profissão atual:

Profissão anterior:

Hábitos (há quanto tempo? Quantidade diária? Parou há quanto tempo?)

Tabaco:

Álcool:

Drogas:

**2 Histórico Médico**

Doenças sistêmicas e medicamentos em uso (tempo de diagnóstico):

Doenças oculares (antecedentes pessoais): Cegueira? Glaucoma? Infecções?

Doenças oculares (antecedentes familiares): Cegueira? Glaucoma? Infecções?

Faz uso de colírios? Há quanto tempo? Dose diária?

Doenças neurológicas (Epilepsia):

Cirurgias Oculares (refrativas, retina, acidentes, catarata):

## **11 Conclusões:**

## APÊNDICE 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**  
**LABORATÓRIO DE NEUROLOGIA TROPICAL**  
**Av. Generalíssimo Deodoro, 92 – Umarizal – Belém/PA**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da Pesquisa:** Propriedades espaciais das respostas isoladas de cones L e M ao eletrorretinograma: implicações sobre a atividade das vias visuais paralelas.

**Responsável:** Mellina Monteiro Jacob

O Eletrorretinograma é um exame que avalia o funcionamento das células da retina. Serão avaliados neste trabalho pessoas sem problemas visuais, para estudar a distribuição espacial das respostas isoladas de fotorreceptores cones L e M ao eletrorretinograma, refletindo a atividade sugestiva de duas vias pós-receptorais durante a utilização do método de tripla substituição silenciosa em diferentes excentricidades da retina, usando uma técnica não invasiva, o ERG, em humanos.

Os participantes da pesquisa realizarão o exame Eletrorretinograma, sendo esclarecidos sobre os métodos utilizados, assim como sobre os riscos e benefícios. Durante a realização da pesquisa, os voluntários poderão sentir algum desconforto após a colocação do eletrodio (um tipo de fio condutor que vai captar a informação do olho para o computador). Para evitar tal desconforto o voluntário poderá solicitar a aplicação de colírio anestésico. O fio condutor poderá ser retirado em qualquer momento que o voluntário desejar, sem insistência por parte dos pesquisadores para o seu reposicionamento. O posicionamento do fio condutor no olho não causará dor ou qualquer tipo de ferimento. Os voluntários também podem sentir algum desconforto em terem que se deslocar para o local de realização do exame, podendo faltar ao trabalho. Para diminuir este problema, os pesquisadores garantem atestado médico de oftalmologista para justificar as faltas ao trabalho.

O benefício que os participantes terão com a pesquisa é o de passarem por avaliação detalhada da visão não necessitando realizar nenhum tipo de pagamento para isso. Enquanto que a ciência terá como vantagem o ganho de um modelo confiável de funcionamento dos diferentes tipos de cone, contribuindo para o conhecimento de como funciona o sistema visual. Este estudo destina-se a pesquisa. A identidade dos participantes será mantida em sigilo.

A participação neste estudo será voluntária, não sendo realizado nenhum tipo de pagamento em dinheiro, o que significa que nenhuma recompensa será dada, e que nenhum voluntário será obrigado a participar, tendo total liberdade de recusar a participação na pesquisa ou de deixar de participar durante a sua realização, sem dar maiores explicações aos pesquisadores, ou serem questionados quanto às causas da desistência.

---

Assinatura do Orientador  
 Nome: Bruno Duarte Gomes  
 End: Av. Generalíssimo Deodoro nº 92  
 Fone: 3201-6819

---

Assinatura do Pesquisador Responsável  
 Nome: Mellina Monteiro Jacob  
 End: Av. Generalíssimo Deodoro nº 92  
 Fone: 3201-6819  
 Reg.Conselho: 99152-F

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

Assinatura do sujeito da pesquisa ou do responsável

**ANEXOS**

## ANEXO 1: RESUMO DO TRABALHO “THE INFLUENCE OF STIMULUS SIZE ON L- AND M-CONE DRIVEN ELECTRORETINOGRAMS” PUBLICADO NOS ANAIS DO EVENTO “THE ASSOCIATION FOR RESEARCH ON VISION AND OPHTHALMOLOGY – ARVO 2014 – ANNUAL MEETING”

ARVO 2014 Annual Meeting Abstracts by Scientific Section/Group - Visual Neuroscience

**Program Number:** 3506 **Poster Board Number:** D0106

**Presentation Time:** 11:00 AM–12:45 PM

**Infantile nystagmus syndrome in childhood: Isolation of the visual cortical signal**

John P. Kelly<sup>1,2</sup>, Felix Darvit<sup>2</sup>, James O. Phillips<sup>1,2</sup>, Avery H. Weiss<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Ophthalmology OA.6.293, Seattle Children, Seattle, WA; <sup>2</sup>University of Washington, Seattle, WA.

**Purpose:** Visual cortical responses are selectively reduced to checkerboard reversal stimulation when recorded from patients with infantile nystagmus syndrome (INS). This study examined if visual evoked potential (VEP) responses could be improved by signal processing and if these improvements were related to presumed foveation periods.

**Methods:** Subjects were 12 children (0.4 – 14 yrs age) with INS (normal retina without albinism or optic nerve hypoplasia). VEP amplitude, latency, and signal-to-noise ratios (SNR) were recorded to contrast-reversing (1.4 Hz) checkerboards of 163 arc minutes and compared to brief onset of horizontal gratings that reduced retinal image motion (0.5 cycle/degrees, 150/500 ms on/off period; constant mean luminance). Individual VEP epochs underwent 1) latency correction using phase cross correlation, or 2) selection of epochs based on phase consistency at 13 frequencies (5.5-21.9 Hz) in the Fourier domain. The probability of foveation in 9 subjects was estimated by the percentage of time eye velocity was  $\leq 3$  degrees/second from video-oculography.

**Results:** VEP amplitude and SNR was significantly correlated with the probability of foveation for check reversal only (amplitude,  $r = 0.69$ ,  $p = 0.026$ ; SNR,  $r = 0.76$ ,  $p = 0.011$ ). VEP amplitude increased up to 2.5 fold after latency correction ( $p < 0.0001$ ) and increased up to 5.4 fold after selective averaging based on phase consistency ( $p < 0.0001$ ). Improvement in amplitude was always greater for check reversal compared to pattern-onset. The changes in VEP amplitude were confirmed by similar improvements in SNR ( $p < 0.0001$ ). Phase correction had no effect on latency with either stimulus condition ( $p \geq 0.06$ ). Improvements in VEP amplitude were accounted for by a significant relationship between SNR and the probability of foveation ( $r = 0.66$ ,  $p = 0.038$ ).

**Conclusions:** The reduction in visual cortical signal in patients with INS is significantly related to a reduction in SNR due to reduced foveation periods. This reduction in VEP is associated with loss of VEP coherence or an absence of cortical phase-locking. Our findings were specific to stimuli undergoing retinal image motion, since there was no significant relationship to transient horizontally oriented stimuli. Our VEP analysis likely extracts brief epochs in the visual cortical signal in which the retinal image motion is minimal thus allowing for better visual sampling.

**Commercial Relationships:** John P. Kelly, None; Felix Darvit, None; James O. Phillips, None; Avery H. Weiss, None  
**Support:** Peter LeHaye, Barbara Anderson, and William O. Rogers Endowment Funds

**Program Number:** 3507 **Poster Board Number:** D0107

**Presentation Time:** 11:00 AM–12:45 PM

**Visual evoked cortical potential kernels elicited by m-sequences: a principal component analysis**

Carolina S. Araujo<sup>1</sup>, Givago S. Souza<sup>1,2</sup>, Luiz Carlos L. Silveira<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil; <sup>2</sup>Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil.

**Purpose:** To evaluate the contribution of principal components of the second order kernels of pseudo-random VECF waveform in different combinations of achromatic contrast and spatial frequency.

**Methods:** Nine normal subjects were tested (24.1 $\pm$ 6.2 yo).

Achromatic sinusoidal gratings (8° visual angle) were temporally controlled by an m-sequence in order to simulate pattern reversal presentation mode. Six levels of Michelson contrast (3% to 99%) and seven spatial frequencies (0.4 cpd to 10 cpd) were used. The Veris system was used for visual stimulation, electrophysiological recording, and extraction of the first and second slice of the second order kernel (K2.1 and K2.2, respectively). Principal component analysis was applied in the K2.1 and K2.2 waveforms using singular value decomposition. We estimated the gain of the RMS amplitude of the principal components from K2.1 and K2.2 as a function of contrast and compared with data from retinal ganglion cells published by Kaplan & Shapley (1986).

**Results:** Two principal components (PC) explained most of the variance from each slice of the second order kernel. The variance explained by the PC extracted from the K2.1 was 49 $\pm$ 5% for the first PC and 20 $\pm$ 3% for the second PC, whereas the variance explained by the PC extracted from K2.2 was 44 $\pm$ 3% for the first PC and 22 $\pm$ 2% for the second PC. The K2.1 first PC was very similar to the original K2.1, with the same N1, P1, and P2 components. The K2.1 second PC showed lower amplitudes and were similar to K2.1 first PC. The waveforms of the two PC extracted from K2.2 were dominated by negative polarity waveforms. The contrast-response function of the K2.1 first PC showed higher gain than K2.1 second PC, and both PCs from K2.2, mainly at low and intermediate spatial frequencies. The mean RMS amplitude function versus contrast of K2.1 first PC co-varied well with M cell responses from Kaplan & Shapley (1986), while contrast-response functions of K2.1 second PC and both PCs from K2.2 co-varied well with P cell responses from Kaplan & Shapley (1986).

**Conclusions:** K2.1 first principal component seems to be generated by the activity of a high contrast sensitivity pathway, while the other major K2.1 and K2.2 components seem to be generated by a mechanism of low contrast sensitivity. Visual system M and P parallel pathways are natural candidates to represent the generating mechanisms of the second order kernels principal components.

**Commercial Relationships:** Carolina S. Araujo, None; Givago S. Souza, None; Luiz Carlos L. Silveira, None  
**Support:** BRAVO ALLERGAN Grant

**Program Number:** 3508 **Poster Board Number:** D0108

**Presentation Time:** 11:00 AM–12:45 PM

**The influence of stimulus size on L- and M-cone driven electroretinograms**

Mellina M. Jacob<sup>1</sup>, Bruno D. Gomes<sup>1</sup>, Givago S. Souza<sup>1,2</sup>, Manoel da Silva<sup>1</sup>, Declan J. McKeefry<sup>3</sup>, Neil R. Parry<sup>4</sup>, Luiz Carlos L. Silveira<sup>1,2</sup>, Jan Kromers<sup>5</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil; <sup>2</sup>Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil; <sup>3</sup>Bradford School of Optometry and Vision Science, University of Bradford, Bradford, United Kingdom; <sup>4</sup>Vision Science Centre, Manchester Royal Eye Hospital, Manchester, United Kingdom; <sup>5</sup>Department of Ophthalmology, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany.

**Purpose:** To determine the ERG responses to isolated L- and M-cone stimuli as a function of stimuli size and temporal frequency, and correlate them with post-receptoral pathways properties.

**Methods:** Flicker ERGs were recorded monocularly from four trichromatic subjects using corneal fiber electrodes. Sinusoidal stimuli were presented in a Ganzfeld bowl, containing four colored light-emitting diodes (LED). The mean luminance of the white background was 284 cd/m<sup>2</sup>. A triple “silent substitution” method was applied, resulting in either L-cone or M-cone isolating stimuli each at

## ARVO 2014 Annual Meeting Abstracts by Scientific Section/Group - Visual Neuroscience

10% cone contrast. Flicker ERG measurements were repeated at five temporal frequencies (8, 12, 30, 36 and 48 Hz), in 14 different spatial stimulus configurations implemented by black cardboard field stops: one full-field stimulus, seven circular stimuli varying in size between 10° and 70° in 10° steps, and six annular stimuli with 70° outer diameter and inner diameters between 10° and 60° varying in 10° steps. Fast Fourier Transform (FFT) was used to extract amplitude and phase from the fundamental component. L/M ratio and phase difference were estimated from the averaged responses.

**Results:** At 8 and 12 Hz, the averaged amplitudes were constant for all stimuli configurations, and the L/M ratio was close to unity. In 30, 36 and 48 Hz, ERG amplitude increased with increasing stimulus size. L-cone driven ERGs were slightly larger than M-cone driven ERGs. The L/M ratio varied with stimulus size and was particularly large for full field stimuli. The L/M ratio differed for 30, 36 or 48 Hz frequencies.

**Conclusions:** The data confirm results that we presented at last year's ARVO using reddish backgrounds and suggest that ERG responses to low and high temporal frequencies stimuli are processed by different post-receptoral mechanisms, probably parvocellular and magnocellular pathways. In addition, the L/M ratio for the high frequency mechanism depends upon stimulus size but also on temporal frequency.

**Commercial Relationships:** Mellina M. Jacob, None; Bruno D. Gomes, None; Givago S. Souza, None; Manoel da Silva, None; Declan J. McKeefry, None; Neil R. Parry, None; Luiz Carlos L. Silveira, None; Jan Kremers, None  
**Support:** A "Science without borders" stipend from CNPq, FDF grant KR 1317/13-1. LCLS is a CNPq research fellow

**Program Number:** 3509 **Poster Board Number:** D0109

**Presentation Time:** 11:00 AM–12:45 PM

#### Rod- and cone-isolated flicker electroretinograms and their response summation characteristics

J. Jason McNamary, Jason C. Park, Dingcai Cao. Ophthalmology and Visual Sciences, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL.

**Purpose:** To define the amplitude and phase characteristics of rod- and cone-isolated flicker electroretinograms (ERGs) and to determine how rod and cone responses summate to generate the non-receptor-isolated flicker ERG.

**Methods:** Following 30 minutes of dark-adaptation, full-field ERGs were obtained from four normally-sighted subjects (ages 25 to 36 years) using a 4-primary LED-based Ganzfeld photostimulator and standard ERG recording techniques. The 4 primaries were either modulated sinusoidally in phase to achieve simultaneous rod and cone activation (ERG<sub>rod+cone</sub>; non-receptor-isolated) or in different phases to achieve rod-isolated (ERG<sub>rod</sub>) and cone-isolated (ERG<sub>cone</sub>) responses by means of triple silent substitution. ERGs were measured at two mean luminance levels (2.4 cd/m<sup>2</sup> and 24 cd/m<sup>2</sup>) and four temporal frequencies (2, 4, 8, and 15 Hz). The amplitude and phase of the fundamental response component for each condition were derived by Fourier analysis.

**Results:** At both luminance levels, response phase decreased approximately linearly as stimulus temporal frequency increased for all three paradigms, with the ERG<sub>rod</sub> and ERG<sub>cone</sub> phases differing by approximately 180 deg at all frequencies. The relationship between response amplitude and stimulus frequency was complex and depended on the paradigm and mean luminance level. Specifically, ERG<sub>rod</sub> amplitude decreased as stimulus frequency increased for both luminance levels, whereas ERG<sub>cone</sub> amplitude depended on mean luminance: at 2.4 cd/m<sup>2</sup>, ERG<sub>cone</sub> amplitude decreased as stimulus frequency increased; at 24 cd/m<sup>2</sup>, ERG<sub>cone</sub> amplitude decreased from 2 to 8 Hz and increased from 8 to 15 Hz.

There were substantial differences under the ERG<sub>rod+cone</sub> paradigm at the two luminance levels: the relationship between response amplitude and stimulus frequency was weakly band-pass at 2.4 cd/m<sup>2</sup> and was U shaped at 24 cd/m<sup>2</sup>, due to ERG<sub>rod</sub> and ERG<sub>cone</sub> responses having similar amplitudes and opposite phases at 4 and 8 Hz.

**Conclusions:** The pattern of responses for the combined rod and cone paradigm at both luminance levels can be accounted for by the summation of signals arising from the rod and cone pathways that have opposite response phase. Destructive interference between the rod and cone pathway signals was greatest for conditions that generated similar rod and cone ERG amplitudes, resulting in decreased amplitude under the combined rod and cone condition.

**Commercial Relationships:** J Jason McNamary, None; Jason C. Park, None; Dingcai Cao, None  
**Support:** NIH research grant R01EY019510 (JM), R01EY019651 (DC), NIH core grant P30EY001792, and an unrestricted departmental grant from Research to Prevent Blindness.

**Program Number:** 3510 **Poster Board Number:** D0110

**Presentation Time:** 11:00 AM–12:45 PM

#### Contribution of oscillatory potentials to the ON- and OFF- photopic electroretinogram (ERG) in human

Jonathan Gotzmann<sup>1</sup>, Ioannis Dimopoulos<sup>2</sup>, Peter Savae<sup>2,1</sup>.

<sup>1</sup>Physiology, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada;

<sup>2</sup>Ophthalmology, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.

**Purpose:** To describe changes in the time, power and frequency domain of the ON (b-wave) and OFF (d-wave) oscillatory potential (OP) components of the human ERG.

**Methods:** Full-field ERG ON- and OFF- responses were recorded from the eyes of 9 healthy subjects (aged 20–49 years) with dilated pupils using DTL fiber electrodes and an Espion e2 system (Diagnosys LLC, 0.3–300Hz bandpass), with 30 cd.m<sup>-2</sup> background adaptation and stimulus intensity of 2.75 log cd.m<sup>-2</sup>. Light stimulus duration was increased in a stepwise fashion from 10ms to 800ms in eight steps. A total of 20 traces were averaged at each step.

Oscillatory potentials of the b- and d-waves were analyzed with trough-to-peak measurement and also Fast-Fourier-Transform (FFT) to determine the dominant power (μV<sup>2</sup>) and frequency (Hz).

**Results:** Four distinct OP peaks were consistently phase-locked to the ON response (ON-OPs). Power of the ON-OPs peaked at shorter duration stimuli (<20ms) followed by an exponential decay with longer durations. The dominant frequency remained ~140Hz for all durations. The ON-OPs (OP1–4) timing also remained constant for all stimulus durations (peaks at t=19ms, t=25ms, t=32ms and t=40ms after stimulus onset) with amplitudes remaining constant after a stimuli durations >20ms. For the OFF phase, two distinct OPs were distinguished. The OFF-OPs (OP1–2) timing remained constant for stimuli durations >100ms (peaks at t=19ms and t=26ms after stimulus offset). The dominant power of the OFF-OPs increased with stimulus duration, reaching a plateau after a 500ms duration. The dominant frequency remained ~120Hz for all durations. At a short duration stimulus of 10ms OFF-OP1 significantly contributed to ON-OP3, while with a stimulus duration of 20ms, OFF-OP1 contributed significantly to ON-OP4. The OP peaks measured from a filtered trace precede the peaks found in the raw trace by 1–2ms for both the ON and OFF response.

**Conclusions:** Our results imply that OPs to short duration stimuli, as used in the clinic, represent a mixed contribution from both the ON and OFF retina circuitry. Selective testing of these two distinct circuits would be optimally achieved using longer duration stimuli such as 200 msec, which allows a clear separation of both response

**ANEXO 2: ARTIGO INTITULADO “THE SPATIAL PROPERTIES OF L- AND M-CONE INPUTS TO ELECTRORETINOGRAMS THAT REFLECT DIFFERENT TYPES OF POST-RECEPTORAL PROCESSING”, PUBLICADO NA REVISTA “PLOS ONE”**



RESEARCH ARTICLE

# The Spatial Properties of L- and M-Cone Inputs to Electroretinograms That Reflect Different Types of Post-Receptor Processing

Mellina M. Jacob<sup>1,2</sup>, Gobinda Pangen<sup>1</sup>, Bruno D. Gomes<sup>2</sup>, Givago S. Souza<sup>2,3</sup>, Manoel da Silva Filho<sup>2</sup>, Luiz Carlos L. Silveira<sup>2,3</sup>, John Maguire<sup>5,6</sup>, Neil R. A. Parry<sup>4,5,6</sup>, Declan J. McKeefry<sup>6</sup>, Jan Kremers<sup>1,6\*</sup>

**1** Department of Ophthalmology, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany, **2** Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil, **3** Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil, **4** Centre for Hearing and Vision Research, Institute of Human Development, University of Manchester, United Kingdom, **5** Vision Science Centre, Manchester Royal Eye Hospital, Central Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust, Manchester Academic Health Science Centre, Manchester, United Kingdom, **6** School of Optometry and Vision Science, University of Bradford, United Kingdom

\* [jan.kremers@uk-erlangen.de](mailto:jan.kremers@uk-erlangen.de).



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Jacob MM, Pangen G, Gomes BD, Souza GS, da Silva Filho M, Silveira LCL, et al. (2015) The Spatial Properties of L- and M-Cone Inputs to Electroretinograms That Reflect Different Types of Post-Receptor Processing. *PLoS ONE* 10(3): e0121218. doi:10.1371/journal.pone.0121218

**Academic Editor:** Stephan C.F. Neuhauss, University Zürich, SWITZERLAND

**Received:** October 20, 2014

**Accepted:** January 29, 2015

**Published:** March 18, 2015

**Copyright:** © 2015 Jacob et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the DFG grant KR1317/13-1 to JK. MMJ was supported by a CNPq Science without Borders fellowship. MSF and LCLS are CNPq research fellows. JK was supported by the Hertie Foundation. NRAPs and JMs participations were facilitated by the Manchester Biomedical Research Centre and the Greater Manchester Comprehensive Local Research Network. GSS was supported by CNPq grant #486545/2012-1. The funders had no role in study design, data collection

## Abstract

We studied the spatial arrangement of L- and M-cone driven electroretinograms (ERGs) reflecting the activity of magno- and parvocellular pathways. L- and M-cone isolating sine wave stimuli were created with a four primary LED stimulator using triple silent substitution paradigms. Temporal frequencies were 8 and 12 Hz, to reflect cone opponent activity, and 30, 36 and 48 Hz to reflect luminance activity. The responses were measured for full-field stimuli and for different circular and annular stimuli. The ERG data confirm the presence of two different mechanisms at intermediate and high temporal frequencies. The responses measured at high temporal frequencies strongly depended upon spatial stimulus configuration. In the full-field conditions, the L-cone driven responses were substantially larger than the full-field M-cone driven responses and also than the L-cone driven responses with smaller stimuli. The M-cone driven responses at full-field and with 70° diameter stimuli displayed similar amplitudes. The L- and M-cone driven responses measured at 8 and 12 Hz were of similar amplitude and approximately in counter-phase. The amplitudes were constant for most stimulus configurations. The results indicate that, when the ERG reflects luminance activity, it is positively correlated with stimulus size. Beyond 35° retinal eccentricity, the retina mainly contains L-cones. Small stimuli are sufficient to obtain maximal ERGs at low temporal frequencies where the ERGs are also sensitive to cone-opponent processing.

## Introduction

There is increasing evidence that flicker electroretinograms (ERGs) to stimuli containing luminance and red-green chromatic information are governed by two mechanisms that probably

and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

reflect the activity of the magno- and parvocellular retino-geniculate-cortical pathways [1–3]. At high temporal frequencies ( $>30$  Hz), the ERG has properties that resemble those of the magnocellular-based luminance pathway. At intermediate frequencies (8–12 Hz), the ERG has properties that are reminiscent of those of the red-green chromatic channel based on activity of the parvocellular pathway.

L- and M-cone isolating stimuli contain luminance and red-green chromatic information and thus can be used to study cone input to the two post-receptor pathways. For instance, the relative strengths of signals driven by the long (L-) and middle (M-) wavelength sensitive cones in the two channels can be estimated [4,5]. It was found that the L- to M-cone response ratio is variable between individuals but generally larger than unity in ERGs at high temporal frequencies, corresponding to psychophysical findings relating to the luminance channel [5]. This L/M ratio is further correlated with the ratio of L- to M-cone numbers [6] and of L- to M-cone photopigment density [5]. In contrast, the L/M response ratio is close to unity in the red-green chromatic channel and in the 12 Hz flicker ERG.

Isolation of the responses of single photoreceptor types can be achieved by the silent substitution technique [7–9]. The amount of hyperpolarization of the photoreceptors after a photoisomerization is always the same and does not depend on the wavelength of the absorbed photon (this is the so-called principle of univariance). As a result, a stimulus will not alter the excitation of a photoreceptor type (and thus is silent) when the number of photoisomerizations does not change. The number of isomerizations can be calculated if the fundamentals of the photoreceptors (their absorption spectra corrected for preretinal absorption) and the emission spectra of the primaries (light sources) in the stimulus are known. The number of photoreceptor types that can be stimulated independently by a stimulus equals the number of primaries with independent spectra.

The distribution of L- and M-cones has been studied using various techniques. Adaptive optics have revealed the pattern of L- and M-cone distribution in the central retina [10]. Gene expression, measured by cone pigment messenger RNA (mRNA), may give a reliable estimate of the L- and M-cone distribution also at larger eccentricities because M and L cones produce equal amount of mRNA. Thus, it is possible to analyze the differences in cone distribution between central and peripheral retina. It has been observed that the L-/M-mRNA ratio increases with increasing eccentricity [11–13].

ERG data can reveal similar eccentricity dependent changes in the ratios of L- to M-cone driven signals. Using custom-built equipment for wide-field multifocal ERG recordings with red and green LEDs as light sources, Kuchenbecker and colleagues [14], reported a large increase in the relative sensitivity to red light compared to green light in the far peripheral retina, suggesting an increase in L/M ratio with increasing eccentricity.

Challa and colleagues [15], used the double silent substitution method to investigate L- and M-cone driven ERG responses to flickering stimuli at two different temporal frequencies (12 and 30 Hz) and for different spatial stimulus configurations. Double silent substitution meant that, in addition to the cone type under examination, they could not fully control an additional S-cone contribution, although asserted that this would have a negligible impact. Their results showed that at 12 Hz the L/M cone ratio was about unity for all stimuli. At 30 Hz the L/M ratio strongly depended on stimulus size, implying that the relative input strengths of the L- and M-cones to the non-opponent mechanism change with retinal eccentricity [confirming earlier data [4]].

However, for complete isolation of the L- or M-cone responses, triple silent substitution is necessary (so that three photoreceptor types are silenced leaving only the fourth photoreceptor type—either the L- or the M-cones—to respond) which is only possible with stimulators having at least four independent primaries [16]. This assumes that responses of intrinsically responsive

retinal ganglion cells that contain melanopsin do not contribute to the ERG. Full isolation could not be achieved in previous electrophysiological experiments using CRT screens [1,15] or two-primary LED stimulators [14]. In previous experiments, the triple silent substitution method was verified in dichromats, who lack either L- or M-cones [17–20]. Another disadvantage of the previous methods was that full field stimulation (stimulation of the complete retina) could not be achieved. It was therefore not possible to study the spatial arrangement of the L- and M-cone driven signals in the far periphery (beyond about 50°).

The aim of the present study was to examine in detail the spatial distribution of L- and M-cone driven responses in ERGs reflecting activity of the two post-receptoral (presumably magnocellular and parvocellular) pathways while using the triple silent substitution paradigm and including conditions wherein far peripheral cones were stimulated so L- and M-cone driven ERG signals can be studied for the complete retina. To be able to do this, we used a Ganzfeld bowl with four differently colored LED arrays as a stimulator.

The results confirm the presence of two separate mechanisms that mediate ERG responses. At high temporal frequencies (>30 Hz), the response amplitude is positively correlated with stimulus area. At intermediate temporal frequencies (8 and 12 Hz) the responses are already maximal for a relatively small stimulus area.

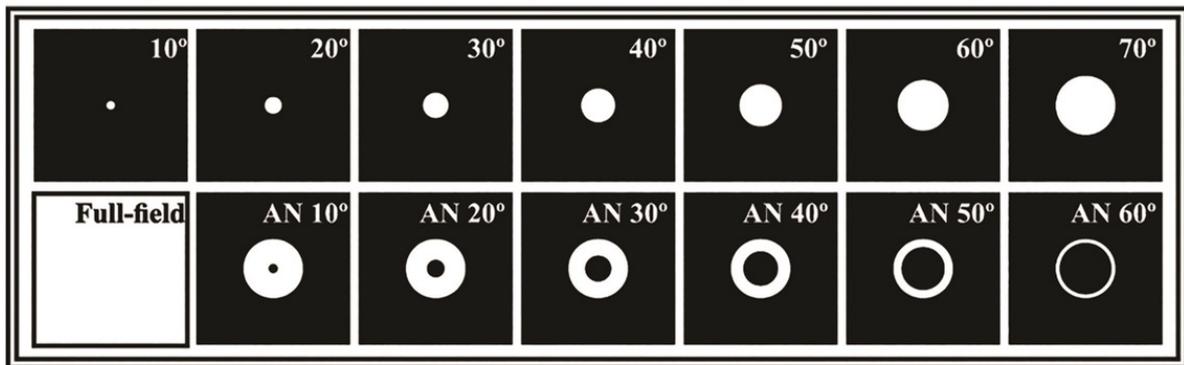
## Materials and Methods

### Subjects

In total, 8 subjects participated in the experiments. Three experimental procedures were employed (see below). The main experiment (Experiment 1) was conducted with four subjects (three males and one female, aged between 28 and 53 years). In Experiment 2 one female subject (age 28 years) participated. In Experiment 3, five male observers, ranging in age between 29 and 54 years participated. All observers were healthy and underwent an ophthalmological evaluation to exclude the presence of any retinal disorders. All had normal color vision as established with the Farnsworth Munsell D-15 color arrangement test and the HMC anomaloscope (Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Germany). All subjects signed an informed consent prior to the experiments, which followed the tenets of the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the local institutional ethics committee (medical faculty of the University Erlangen-Nürnberg) on human experimentation.

### Visual stimulation

The visual stimuli were generated by a RETIport system (Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburg a. d. Havel, Germany) presented using a Ganzfeld bowl (Q450SC; Roland Consult), containing six arrays of differently colored light-emitting diodes (LEDs), which were independently driven by the RETIport system. For the current experiment, we used four narrow band LEDs: green, orange, blue, and red. Stimuli were sine-wave modulations of the luminance output of each of the LEDs. The responses were measured for 14 different spatial stimulus configurations: one full-field stimulus, seven circular stimuli varying in size between 10° and 70° in 10° steps, and six annular stimuli with 70° outer diameter and inner diameters between 10° and 60° varying in 10° steps (see Fig. 1). The spatial configurations were created by black cardboard field stops that were positioned 3 cm from the observer. Since the observers accommodated on a fixation spot at about 30 cm distance, the edges of the field stops were extremely blurred. The experiments were performed in a dark room. In Experiment 2, the effects of stray light were studied. In that experiment, we used white card board that was illuminated and the experiments were performed under normal room lighting.



**Fig 1. Spatial stimulus configuration of circular and annular stimuli used for ERG recordings.**

doi:10.1371/journal.pone.0121218.g001

In all experiments, L- and M- cone isolating sine-wave stimuli were created using triple silent substitution [7–9]. In Experiments 1 and 2, the mean luminance was  $284 \text{ cd/m}^2$ . The mean chromaticity was white with CIE1931 coordinates:  $x = 0.3531$ ,  $y = 0.3181$ . The luminance for each LED array was:  $124 \text{ cd/m}^2$  green (523 nm, CIE1931:  $x = 0.2016$ ,  $y = 0.7371$ ),  $67 \text{ cd/m}^2$  orange (594 nm, CIE1931:  $x = 0.5753$ ,  $y = 0.4240$ ),  $44 \text{ cd/m}^2$  blue (469 nm, CIE1931:  $x = 0.1255$ ,  $y = 0.0926$ ), and  $49 \text{ cd/m}^2$  red (638 nm, CIE1931:  $x = 0.6957$ ,  $y = 0.2966$ ). In Experiment 3, the mean luminance was also  $284 \text{ cd/m}^2$  (red, orange, green, and blue LEDs: 80, 160, 40, and  $4 \text{ cd/m}^2$  respectively) but with a reddish mean chromaticity (CIE1931 coordinates:  $x = 0.5951$ ,  $y = 0.3857$ ).

In Experiments 1 and 2, the cone contrast was 10%. The contrast in the silenced photoreceptors was 0%, except for the M-cone isolating condition where S-cone contrast was 2% and rod contrast was 2% (the minus sign indicates a counter-phase modulation whereas a positive sign indicates in-phase modulation). We were forced to allow this small S-cone and rod modulation to ensure that a 10% M-cone modulation was possible. In previous experiments [17], we found that the response amplitudes of S-cone- and rod-driven responses were substantially smaller than M-cone driven responses even if the S-cone- and rod-contrasts were substantially higher than the M-cone contrast. The small rod and S-cone modulation in the M-cone isolating condition will therefore result in negligible S-cone- and rod-driven responses. In Experiment 3, pure L- and M-cone isolating conditions, each with 18% cone contrast and 0% contrast in the silenced photoreceptors, were used.

In Experiment 1, the measurements were performed at five temporal frequencies: 8, 12, 30, 36 and 48 Hz. In Experiment 2, we used 12 and 30 Hz stimuli. In Experiment 3, we used 12 and 36 Hz stimuli.

### ERG recording

Electroretinographic recordings were acquired using the RETiport system (Roland Consult). They were recorded monocularly from either the right or left eye. The pupils were dilated with a drop of 0.5% tropicamide (Pharma Stulln GmbH, Stulln, Germany). Anesthetic eye drops of oxybuprocain hydrochloride 0.04% (Dr. Mann Pharma, Berlin, Germany) were administered when requested by the observer. A corneal fiber (DTL) electrode, placed over the lower conjunctiva and attached close to the inner and outer cantus, was used as active electrode. Gold cup electrodes were placed on the forehead and the ipsilateral temple and used as ground and

reference electrodes respectively. Gold cup electrodes were positioned with an electrode paste (DO Weaver & Company, Aurora, Colorado, USA), after the skin was cleaned with Nuprep abrasive skin preparing gel (DO Weaver & Company). Impedances were generally below 5 k $\Omega$ .

ERGs were averaged from between 80 and 160 epochs each lasting one second. To avoid onset artifacts, the recordings commenced 2 sec after start of the stimulus. The signals were amplified and band-pass filtered between 1 and 300 Hz and they were digitized at 1024 Hz.

## Analysis

The ERG responses were Fourier analyzed (using FFT) with custom written programs in MATLAB R2011b (Mathworks, Massachusetts, USA). Amplitudes ( $amp(Fr)$ ) and phases of the first (fundamental) harmonic components were extracted. From the FFTs, the average of component amplitudes at the stimulus frequency +1 Hz and -1 Hz ( $Amp(Fr+1)$  and  $Amp(Fr-1)$ ); e.g. with 12 Hz stimuli, these were the components at 11 Hz and 13 Hz) were calculated and defined as the noise in the concerning experiments. The signal-to-noise ratio SNR is given by:

$$SNR = \frac{AmpFr}{\sqrt{\frac{AmpFr+1 + AmpFr-1}{2}}} \quad 1$$

Signals were accepted for further analysis when the SNR was larger than 2.

The Fourier analysis returns phases within a 360° range. Thus, the absolute phase can differ by multiples of 360°. To set the absolute phases of responses from different subjects we assumed that they did not differ more than 180°. Amplitudes and phases were averaged arithmetically.

## Results

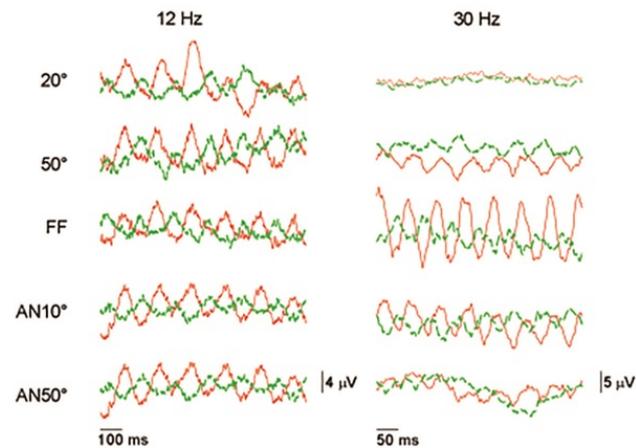
### Experiment 1

In Experiment 1, the L- and M-cone driven ERGs were measured at five temporal frequencies with the 14 spatial stimulus configurations (see Fig. 1), from four subjects. Original recordings, measured in one subject, obtained with 12 Hz and 30 Hz L- and M- cone isolating stimuli, each at 10% cone contrast, are shown in Fig. 2. The figure shows the responses for a representative set of five spatial stimulus configurations. The results of the responses to the remaining spatial configurations are not shown for clarity. It can be observed that the responses to 12 Hz stimuli (left column) do not change as strongly with spatial stimulus configuration as the 30 Hz responses (right column).

While the amplitude of the L- cone driven responses is larger than those of the M-cone driven responses at high temporal frequencies (and particularly for the full field [FF] responses), the amplitude differences are smaller at 12 Hz. At 8 Hz almost no amplitude differences were observed.

The averaged amplitudes and L/M amplitude ratio data from the four subjects who participated in this experiment are displayed in Fig. 3 as a function of spatial stimulus configuration. The data are shown separately for each temporal frequency. The SNR varied between about 16 and 0.5 and depended on subject, temporal frequency and spatial configuration. The SNR was large for the 30 and 36 Hz stimuli and the FF conditions. The SNR for the 10°, 48 Hz M-cone isolating condition was below the criterion of 2 for all four subjects and these data therefore were not included.

At high temporal frequencies (30, 36 and 48 Hz), the response amplitudes increased with increasing stimulus area (i.e. with increasing diameter of the circular stimuli and decreasing diameter of the central ablation of the annular stimuli). The FF L-cone driven responses were considerably larger than those to the other stimuli. In contrast, the FF M-cone driven responses



**Fig 2. Original ERG traces.** Original ERG traces for L- (10% cone contrast, dark red traces) and M-cone (10% cone contrast, green dashed traces) isolating stimuli, measured in one subject. The responses from two temporal frequencies (500 ms excerpts at 12 Hz and 200 ms excerpts at 36 Hz) and five different spatial configurations (20°, 50°, FF, AN10°, AN50°) are shown.

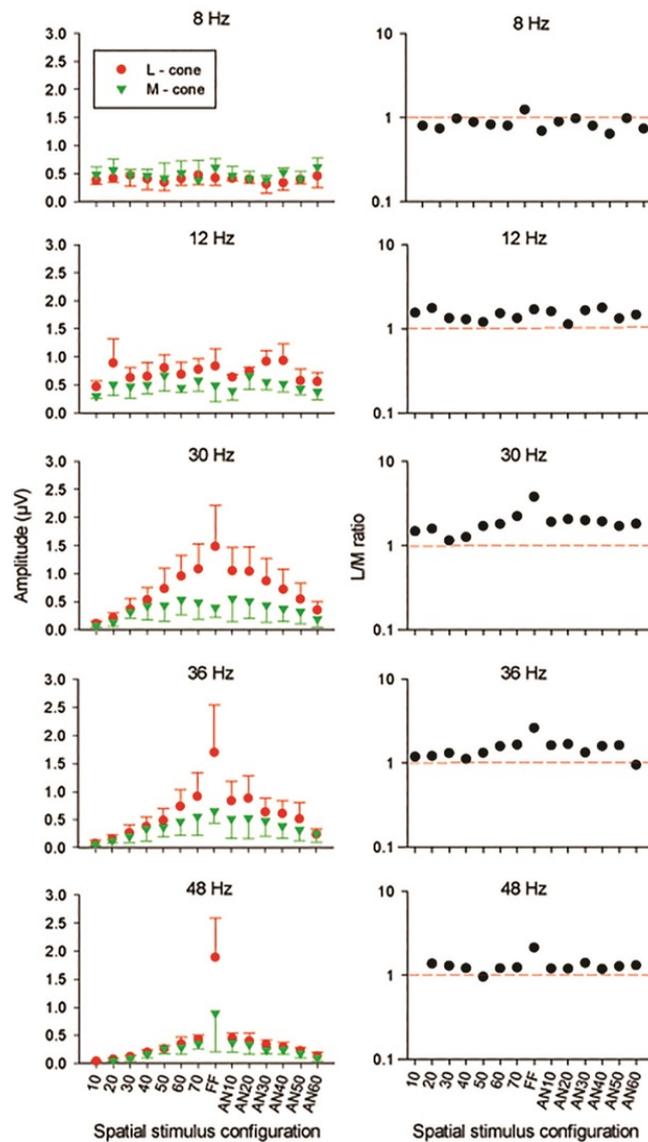
doi:10.1371/journal.pone.0121218.g002

exhibited relatively smaller increases compared to those obtained with the 70 stimuli. The amplitude ratios decreased with increasing temporal frequency (Fig. 3; right plots) and were closer to unity for the 48 Hz stimuli, except for the FF responses. The L/M amplitude ratios decreased (and approached unity) when the ERGs were measured with smaller stimuli.

At 8 and 12 Hz, the averaged amplitudes of L- and M-cone driven responses were very similar and did not depend strongly on spatial stimulus configuration. As a result, the L/M ratios were close to unity for all stimulus configurations. In conclusion, the ERG amplitudes measured at 8 and 12 Hz, on the one hand, and at high temporal frequencies on the other, display distinctly different characteristics. This finding is in agreement with previous data [1, 3, 15] that demonstrate the ERGs at intermediate and high temporal frequencies are governed by two distinct mechanisms.

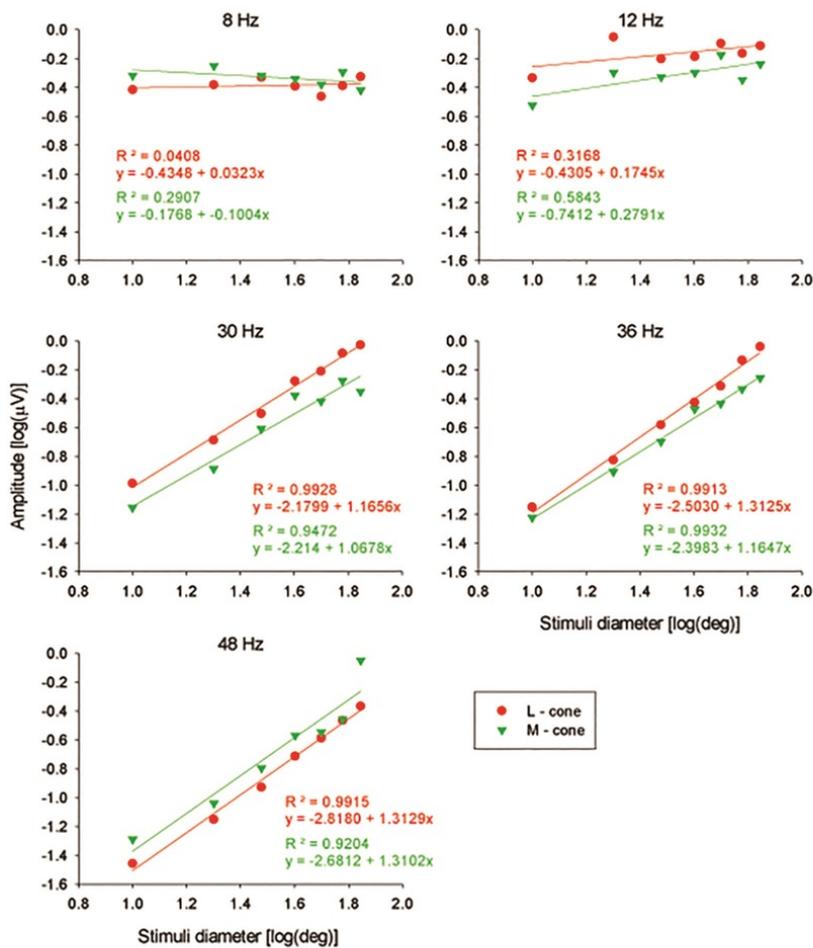
To study the dependency of amplitude on stimulus size in more detail, we plotted them as a function of the circular stimulus diameter (i.e. excluding the responses to FF and the annular stimuli; see Fig. 4) using double logarithmic scaling. At 8 and 12 Hz, the response amplitudes were relatively constant. This result is surprising because it suggests that only a small retinal area when stimulated was sufficient to elicit a maximal response. At high temporal frequencies (30 Hz and above), the L- and M-cone driven response amplitudes were positively correlated with stimulus size. The relationship between amplitude and stimulus size was similar, but not identical, for L- and M-cone driven responses and was approximately linear in the double logarithmic plot with  $r^2$  values exceeding 0.92. The slopes of the linear regression were between 1.1 and 1.6  $\log(\mu\text{V})/\log(\text{deg})$ .

The averaged response phase obtained for each of the five temporal frequencies is shown as a function of spatial stimulus configuration in the left plots of Fig. 5. The responses were phase advanced when stimulus area increased for both circular and annular stimuli. The responses to full field stimuli were considerably phase advanced relative to the other responses. This was particularly the case at high temporal frequencies. Overall, the phases of L- and M-cone driven responses varied in a similar manner as a function of stimulus configuration. As a result, the



**Fig 3. Amplitude data.** Averaged amplitude (left plots; linear scale) for L- (red circles) and M- cone (green triangles) driven ERG responses as a function of stimulus configuration at 5 different temporal frequencies. The errors bars indicate the standard deviation. L-M ratio (right plots) estimated from the averaged amplitude at each temporal frequency. The red dashed lines indicate L/M ratio corresponding to unity.

doi:10.1371/journal.pone.0121218.g003



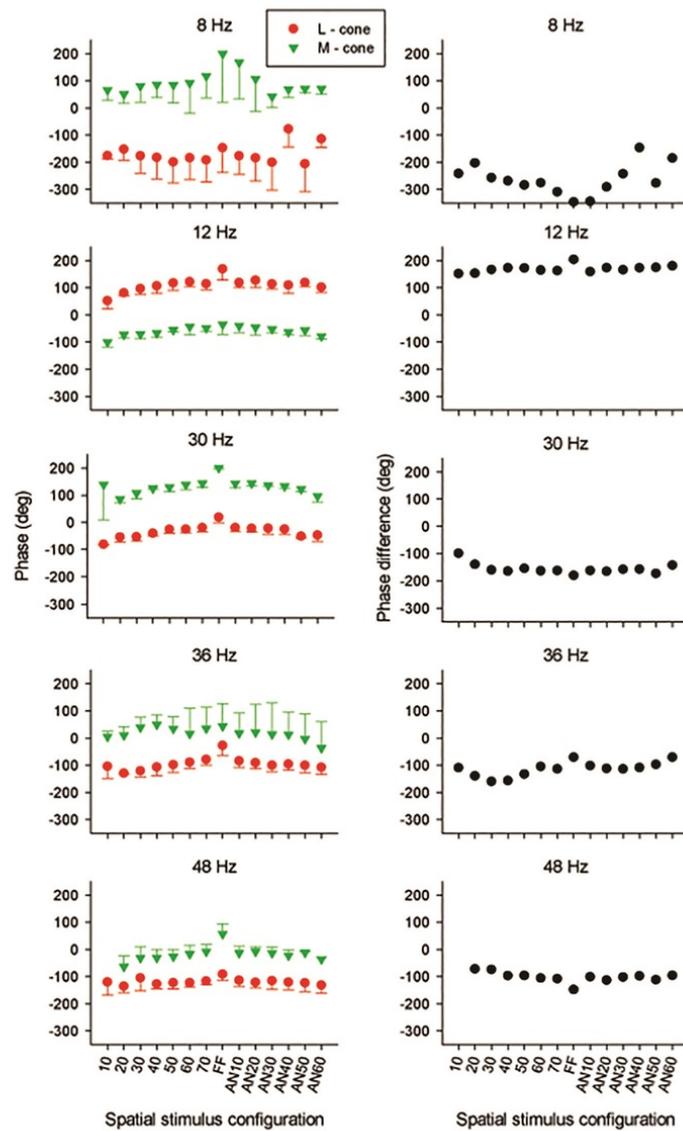
**Fig 4. Amplitudes as a function of stimulus diameter.** Linear regression analysis between the logarithm of amplitude and the logarithm of stimulus diameter for L-cone (red circles) and M-cone (green triangles) driven ERGs at 5 different temporal frequencies. The regression coefficient ( $R^2$ ) and the linear regressions are showed for each regression.

doi:10.1371/journal.pone.0121218.g004

averaged phase differences between the two (Fig. 5 right plots) were relatively independent of stimulus configuration. At 12 Hz, the phase difference was close to  $180^\circ$ , indicating that the L- and M-cones are operating in an opponent fashion. The phase differences were about  $170^\circ$  at 30 Hz stimuli and about  $100^\circ$  at 36 and 48 Hz.

## Experiment 2

The finding that the response amplitudes obtained at low temporal frequencies were largely independent of stimulus configuration (Figs. 3 and 4) was surprising. In a previous study [15], size dependent response amplitudes were found also at 12 Hz, even though the L/M ratios,



**Fig 5. Phase data.** Averaged phase values (left plots) for L- (red circles) and M- cone (green triangles) driven ERG responses as a function of stimuli configuration at 5 different temporal frequencies. The right plots correspond to the averaged L-M phase difference estimated from phase responses at each temporal frequency.

doi:10.1371/journal.pone.0121218.g005

measured at 12 and 30 Hz, were similar as in the present study. In the previous study, a CRT screen was used as stimulator and the non-stimulated area had the same mean luminance as the stimulus. In Experiment 1, the stimulus was blocked by black cardboard and the measurements were performed in a darkened room. Therefore the ERG responses obtained in Experiment 1 were possibly influenced by stray light. Although stray light would not be expected to have an effect only at low temporal frequencies, we repeated the 12 and 30 Hz measurements in one subject using illuminated white cardboard as field stops to suppress stray light.

The comparison between amplitude values from both experiments showed that amplitudes and phases obtained in the two experiments depended in a similar manner on spatial stimulus configuration (S1 Fig. and S2 Fig.). The amplitudes acquired with the white surround were only slightly smaller than those obtained with a black surround. This was observed for both temporal frequencies. In conclusion, stray light probably had an influence on absolute response amplitudes but not on the relationship between amplitude and spatial stimulus configuration.

### Experiment 3

We also studied the effects of mean chromaticity because it was previously found that state of adaptation may strongly influence the results [21]. We therefore repeated the experiments using the same mean luminance but a different mean chromaticity. This allowed us to use larger stimulus strengths (18% cone contrast for L- and M-cone isolating stimuli). With the exception of one subject, the subjects that participated in this experiment did not participate in the main experiment. Although the absolute amplitudes were larger with the reddish background (probably caused by the larger cone contrast) the dependency of amplitude on stimulus configuration was very similar with the two backgrounds. The response phases also were very similar with the two backgrounds (S3 Fig. and S4 Fig.).

## Discussion

### Two separate post-receptoral mechanisms mediate ERG responses

In this study, triple silent substitution stimulation was used to investigate the spatial properties of L- and M-cone driven ERG responses. The results indicate that, in agreement with previous data [1–3], two different mechanisms govern the ERG response. At high temporal frequencies (>30 Hz), the response amplitude was positively correlated with stimulus area. The L/M response amplitude ratio was generally larger than one and increases with increasing stimuli size. In contrast, at intermediate temporal frequencies (8 and 12 Hz), the amplitudes were nearly constant for all stimulus configurations used in the present experiment and the L/M ratios were constant at about unity.

Previous data suggested that the ERGs at high temporal frequencies reflect activity of the luminance pathway. This is also in agreement with the notion that ERG and psychophysical measurements performed at high temporal frequency using heterochromatic flicker photometry results in nearly identical spectral sensitivities (the luminous efficiency function;  $V$ ) with similar L/M ratios and with similar inter-individual variability [22–25]. The present data confirm that the average L/M ratio for spatially restricted stimuli is about two. It was proposed that the ERGs measured at 8 and 12 Hz reflect activity of the L-M cone opponent pathway. L-M cone opponent retinal ganglion cells can respond strongly to high temporal frequency luminance stimuli particularly in the far periphery [26]. However, the L/M ratio in retinal ganglion cells bearing L-M cone opponent signals is about unity [27]. A ratio of about unity was also found for psychophysical flicker detection thresholds provided the L-M chromatic pathway mediated the detection [5,27]. Indeed we also found an L/M ratio close to unity in the present study. Furthermore, the phase difference of about  $180^\circ$  between L- and M-cone driven responses

suggest cone opponent processing. However, at higher temporal frequencies, where a luminance reflecting mechanism is proposed, the phase difference is also large. In addition to the absolute phase difference, the apparent latencies of L- and M-cone driven signals should be taken into account. The apparent latency can be obtained from the slope of the phase vs temporal frequency function. Our sampling of temporal frequencies is too coarse to estimate the apparent latencies. In a previous study with FF stimuli it was found that the apparent latencies of L- and M-cone driven ERG signals are very small at intermediate temporal frequencies whereas there are substantial differences at high temporal frequencies [18] and may cause the large differences between L- and M-cone driven phases at high temporal frequencies.

The fundamental components of the ERG responses to full field sinusoidal luminance stimuli display a minimum for temporal frequencies around 10 Hz [28–31]. Possibly, this minimum in the luminance response provides the possibility to study L-M opponent signals in the ERG. The minimum has been explained by linear interaction between ON and OFF responses [31]. However, the minimum in the fundamental component in luminance responses is accompanied by a maximum in the second harmonic component that cannot be explained by a simple linear model. We therefore offered an alternative model on the basis of two independent ERG mechanisms [29]. It is unclear whether the two mechanisms in the luminance responses correspond to those in the responses to cone isolating stimuli.

### Dependency of ERG responses on spatial stimulus configuration

The amplitude data obtained at 8 and 12 Hz suggest that a relatively small stimulus is enough to elicit a maximal response. This was also found with a completely different ERG recordings setup with a different four primary LED stimulator [32]. The response amplitudes were smaller only for a 10° stimulus (Fig. 3). These results are in contrast with the data of a previous study [15], in which the amplitude varied as a function of the spatial configurations of the stimuli. The discrepancy cannot be explained by the effect of the stray light, as was shown by Experiment 2. Furthermore, stray light effects would also influence the high temporal frequencies responses. A possible explanation for the differences in the results between both studies is the use of different types of stimulators. Challa and colleagues [15] have measured ERGs in different spatial stimuli configuration, using a CRT screen as stimulator. As this type of stimulator is composed of three phosphors (red, green, and blue), the cone modulation is limited by a spectral overlap of these phosphors and by a restricted luminance. These limitations allow only a double silent substitution technique [33]. Furthermore, in contrast to stimuli provided with an LED stimulator, CRT stimuli are not purely sinusoidal and include a sudden rise of the excited phosphors followed by a decay phase and thus contain higher frequencies which may influence the ERG response. The key difference between the present study and that of Challa and colleagues [15] is in the behavior of the M-cone response. We show a constant relationship between L and M cone phase as stimulus size increases, whilst the CRT study exhibited constant L-cone phases but a change in M-cone phase. This was accompanied by a marked increase in L/M ratio with size and lends weight to the signal cancellation hypothesis, which we discuss below. In a parallel study we established this by comparing CRT and ganzfeld responses in the same subjects [32].

The response amplitudes obtained at high temporal frequencies depended on stimulus size. For circular stimuli with diameters between 10° and 70°, the L- and M-cone driven responses increased with increasing stimulus size in a similar manner (resulting in a constant L/M ratio) and could be described by an exponential function with an exponent of between 1.1 and 1.3 (Fig. 4). If the retina was completely homogeneous and every part of the retina would contribute equally to the ERG response, the ERG amplitude could be expected to be proportional to

stimulus area and thus with the square of diameter in which case a slope of two can be expected. The smaller slope suggests the presence of retinal eccentricity dependent changes in cone densities and possibly other factors such as cone to bipolar cell convergence.

For stimuli larger than  $70^\circ$  (i.e. for eccentricities beyond  $35^\circ$ ) the high temporal frequency L- and M-cone driven responses had different characteristics: whereas M-cone driven responses with FF and  $70^\circ$  diameter stimuli had similar amplitudes, L-cone driven responses were substantially larger for FF stimuli. This finding suggests that beyond  $35^\circ$  eccentricity, ERG responses are largely generated by L-cone activity. This is in agreement with previous multifocal ERG data [14] and with eccentricity dependent mRNA expression [12,13] suggesting that L-cones are almost exclusively present in the far periphery. However, as discussed in the next paragraph, FF M-cone driven responses were larger than those obtained with other stimulus configurations at 48 Hz, indicating that M-cones are not completely absent in the far periphery.

### Complex signal interactions at high temporal frequencies

Three aspects of the present data show that even within the high frequency range temporal frequency has a complex influence on the ERG responses (Fig. 3). Firstly, the L/M ratios for all but the FF stimuli decreased from about two at 30 Hz to slightly more than one at 48 Hz. Secondly, the difference between FF responses and those at other stimulus configurations increased with increasing temporal frequency: the 30 Hz L-cone driven FF responses were about 1.5 times larger than the  $70^\circ$  responses, whereas at 48 Hz this ratio was about four. M-cone driven FF responses at 30 Hz were slightly smaller than those to  $70^\circ$  stimuli. At 48 Hz, they were more than a factor of two larger (see Fig. 3). These results indicate that cone driven responses in the far periphery may have different temporal properties compared to central responses. In FF responses, the vector summation of these responses may lead to complicated interactions. For instance, if central and peripheral M-cone driven responses are more than  $90^\circ$  apart at 30 Hz than the combined (FF) response may be smaller than the  $70^\circ$  response because of destructive interactions. Possibly, they are less than  $90^\circ$  apart at higher temporal frequencies, so that the interaction is additive at these temporal frequencies. Thirdly, stimulus configuration and temporal frequency have an effect on the phase differences between L- and M-cone driven responses for different stimuli (Fig. 5, right plots). Possibly, the three effects are caused by the same mechanism. To test this proposal more detailed data at additional temporal frequencies and stimulus configurations are needed.

### Conclusion

In conclusion, using triple silent substitution, it is possible to study the spatial properties of L- and M-cone driven ERG signals into ERGs. The data confirm that ERGs reflect the activity of two different post-receptoral pathways.

### Supporting Information

**S1 Fig. Amplitude results of Experiment 2.** Comparison between 12 and 30 Hz ERG amplitudes measured with black (black triangles) and white surround (open circles) with one subject. Upper and middle plots: L- (left plots) and M-cone (right plots) driven ERG amplitudes. Lower plots: L/M ratio estimated from 12 (left plot) and 30 Hz (right plot) response amplitudes. The red dashed lines indicate unity L/M ratios. (EPS)

**S2 Fig. Phase results of Experiment 2.** Comparison between 12 and 30 Hz ERG phases with black (black triangles) and white surround (open circles) with one subject. Upper and middle plots: L- (left plots) and M-cone (right plots) driven ERG phases. Lower plots: L-M phase differences estimated from 12 (left plot) and 30 Hz (right plot) response phases. (EPS)

**S3 Fig. Amplitude results of Experiment 3.** Comparison between 12 and 36 Hz averaged ERG amplitudes of measured with white (open circles) and reddish background (pink triangles). Upper and middle plots: L- (left plots) and M-cone (right plots) driven ERG amplitudes. Error bars indicate standard deviation. Lower plots: L/M ratio estimated from 12 (left plot) and 36 Hz (right plots) amplitude responses. The red dashed lines indicate unity L/M ratios. (EPS)

**S4 Fig. Phase results of Experiment 3.** Comparison between 12 and 36 Hz averaged ERG phases measured with white (open circles) and reddish background (pink triangles). Upper and middle plots: L- (left plots) and M-cone (right plots) driven ERG phases. Lower plots: L-M phase difference estimated from 12 (left plot) and 36 Hz (right plots) phases. (EPS)

**S1 File. Results Experiment 1 subject JK.**  
(XLSX)

**S2 File. Results Experiment 1 subject KT.**  
(XLSX)

**S3 File. Results Experiment 1 subject MC.**  
(XLSX)

**S4 File. Results Experiment 1 subject MJ.**  
(XLSX)

**S5 File. Results Experiment 2 subject MJ.**  
(XLSX)

**S6 File. Results Experiment 2 all subjects.**  
(XLS)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NRAP DJM JK. Performed the experiments: MMJ GP BDG GSS MDSF JK. Analyzed the data: MMJ JK. Wrote the paper: MMJ LCLS JM NRAP DJM JK.

## References

1. Kremers J, Link B. Electrorretinographic responses that may reflect activity of parvo- and magnocellular post-receptoral visual pathways. *Journal of Vision*. 2008; 8: 1–14.
2. Kremers J, Rodrigues AR, Silveira LCL, da Silva-Filho M. Flicker ERGs Representing Chromaticity and Luminance Signals. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010; 51: 577–587.
3. Parry NR, Murray IJ, Panorgias A, McKeefry DJ, Lee BB, Kremers J. Simultaneous Chromatic and Luminance Human Electrorretinogram Responses. *J Physiol*. 2012; 590: 3141–3154. doi:10.1111/jphysiol.2011.226951 PMID:22586211
4. Murray IJ, Parry NRA, Kremers J, Stepien MW, Schild A. Photoreceptor topography and cone specific electrorretinograms. *Visual Neuroscience*. 2004; 21: 231–235. PMID:15518193

5. Kremers J, Scholl HPN, Knau H, Berendschot TTJM, Usui T, Sharpe LT. L/M cone ratios in human trichromats assessed by psychophysics, electroretinography, and retinal densitometry. *J Opt Soc Am*. 2000; 17: 517–526.
6. Brainard DH, Roorda A, Yamauchi Y, Calderone JB, Metha AB, Neitz M, et al. Functional consequences of the relative numbers of L and M cones. *Journal of the Optical Society of America A*. 2000; 17: 607–614. PMID:10708042
7. Estévez O, Spekreijse H. A spectral compensation method for determining the flicker characteristics of the human colour mechanisms. *Vision Research*. 1974; 14: 823–830. PMID:4419261
8. Estévez O, Spekreijse H. The "silent substitution" method in visual research. *Vision Research*. 1982; 22: 681–691. PMID:7112962
9. Kremers J. The assessment of L- and M-cone specific electroretinographical signals in the normal and abnormal retina. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2003; 22: 579–605. PMID:12892643
10. Hofer H, Carroll J, Neitz J, Neitz M, Williams DR. Organization of the Human Trichromatic Cone Mosaic. *Journal of Neuroscience*. 2005; 25: 9669–9679. PMID:16237171
11. Hagstrom SA, Neitz J, Neitz M. Ratio of M/L pigment gene expression decreases with retinal eccentricity. In: Cavonius CR, editor. *Colour vision deficiencies XIII*. Dordrecht: Kluwer; 1997. pp. 59–65.
12. Hagstrom SA, Neitz J, Neitz M. Variations in cone populations for red-green color vision examined by analysis of mRNA. *Neuroreport*. 1998; 9: 1963–1967. PMID:9674575
13. Hagstrom SA, Neitz M, Neitz J. Cone pigment gene expression in individual photoreceptors and the chromatic topography of the retina. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 2000; 17: 527–537. PMID:10708034
14. Kuchenbecker JA, Sahay M, Tait DM, Neitz M, Neitz J. Topography of the long- to middle-wavelength sensitive cone ratio in the human retina assessed with a wide-field color multifocal electroretinogram. *Visual Neuroscience*. 2008; 25: 301–306. doi:10.1017/S0952523808080474 PMID:18598401
15. Challa NK, McKeefry D, Parry NRA, Kremers J, Murray IJ, Panorgias A. L- and M-cone input to 12Hz and 30Hz flicker ERGs across the human retina. *Ophthalmic and Physiological Optics*. 2010; 30: 503–510. doi:10.1111/j.1475-1313.2010.00758.x PMID:20883333
16. Shapiro AG, Pokorny J, Smith VC. Cone-rod receptor spaces with illustrations that use the CRT phosphor and light-emitting-diode spectra. *Journal of the Optical Society of America A*. 1996; 13: 2319–2328. PMID:8972587
17. Kremers J, Pangeni G. Electroretinographic responses to photoreceptor specific sine wave modulation. *Journal of the Optical Society of America A*. 2012; 29: A309–A316.
18. Kommanapalli D, Murray IJ, Kremers J, Parry NR, McKeefry DJ. Temporal characteristics of L- and M-cone isolating steady-state electroretinograms. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 2014; 31: A113–120. doi:10.1364/JOSAA.31.00A113 PMID:24695158
19. Kremers J, Pangeni G, Tsaousis KT, McKeefry D, Murray IJ, Parry NR. Incremental and decremental L- and M-cone driven ERG responses: II. Sawtooth stimulation. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 2014; 31: A170–178. doi:10.1364/JOSAA.31.00A170 PMID:24695166
20. McKeefry D, Kremers J, Kommanapalli D, Challa NK, Murray IJ, Maguire J, et al. Incremental and decremental L- and M-cone-driven ERG responses: I. Square-wave pulse stimulation. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 2014; 31: A159–169. doi:10.1364/JOSAA.31.00A159 PMID:24695165
21. Kremers J, Stepien MW, Scholl HPN, Saito CA. Cone selective adaptation influences L- and M-cone driven signals in electroretinography and psychophysics. *Journal of Vision*. 2003; 3: 146–160. PMID:12678617
22. Jacobs GH, Deegan JF II. Spectral sensitivity of macaque monkeys measured with ERG flicker photometry. *Visual Neuroscience*. 1997; 14: 921–928. PMID:9364728
23. Jacobs GH, Deegan IJS, Moran JL. ERG measurements of the spectral sensitivity of common chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Vision Research*. 1996; 36: 2587–2594. PMID:8917819
24. Jacobs GH, Neitz J. Electrophysiological estimates of individual variation in the L/M cone ratio. In: Drum B, editor. *colour vision deficiencies XI*: Kluwer Academic publishers; 1993. pp. 107–112.
25. Neitz J, Jacobs GH. Electroretinogram measurements of cone spectral sensitivity in dichromatic monkeys. *Journal of the Optical Society of America A*. 1984; 1: 1175–1180. PMID:6520635
26. Solomon SG, Martin PR, White AJR, Rüttiger L, Lee BB. Modulation sensitivity of ganglion cells in peripheral retina of macaque. *Vision Research*. 2002; 42: 2893–2898. PMID:12450500
27. Smith VC, Lee BB, Pokorny J, Martin PR, Valberg A. Responses of macaque ganglion cells to the relative phase of heterochromatically modulated lights. *Journal of Physiology*. 1992; 458: 191–221. PMID:1302264

28. Odom JV, Reits D, Burgers N, Riemslag FC. Flicker electroretinograms: a systems analytic approach. *OptomVisSci*. 1992; 69: 106–116.
29. Pageni G, Horn FK, Kremers J. A new interpretation of components in the ERG signals to sine wave luminance stimuli at different temporal frequencies and contrasts. *Vis Neurosci*. 2010; 27: 79–90. doi: [10.1017/S0952523810000179](https://doi.org/10.1017/S0952523810000179) PMID:20796325
30. Harwerth RS, Crawford ML, Frishman LJ, Viswanathan S, Smith EL III, Carter C. Visual field defects and neural losses from experimental glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2002; 21: 91–125. PMID:11906813
31. Kondo M, Sieving PA. Post-photoreceptor activity dominates primate photopic 32-Hz ERG for sine-, square- and pulsed stimuli. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002; 43: 2500–2507.
32. Maguire J. The Variation in Cone Isolating ERGs Across the Retina in a Normal Population and Patients Diagnosed with Retinitis Pigmentosa MSc Thesis: University of Manchester. 2012.
33. Murray IJ, Kremers J, Parry NRA. L- and M-Cone isolating ERGs: LED versus CRT stimulation. *Visual Neuroscience*. 2008; 25: 327–331. doi: [10.1017/S0952523808036X](https://doi.org/10.1017/S0952523808036X) PMID:18598403