



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

ALÓDIA BRASIL COSTA

**ESTUDO ELETORRETOGRÁFICO DA ADAPTAÇÃO À LUZ
DE VIAS DE PROCESSAMENTO ESPECÍFICAS DE CONE E DE
OPONÊNCIA EM COR E LUMINÂNCIA**

**Belém
2018**

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

ALÓDIA BRASIL COSTA

**ESTUDO ELETRORRETINOGRÁFICO DA ADAPTAÇÃO À LUZ
DE VIAS DE PROCESSAMENTO ESPECÍFICAS DE CONE E DE
OPONÊNCIA EM COR E LUMINÂNCIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Neurociências e Biologia Celular
Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano.

**Belém
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C837e Costa, Alódia
ESTUDO ELETRORRETINOGRÁFICO DA ADAPTAÇÃO À LUZ DE VIAS DE
PROCESSAMENTO ESPECÍFICAS DE CONE E DE OPOÊNCIA EM COR E LUMINÂNCIA / Alódia
Costa. - 2018.
124 f. : il. color.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC),
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano

1. Adaptação à luz. 2. Eletrorretinograma de campo total. 3. Cone L e M . 4. Via magnocelular. 5. Via
parvocelular. I. Herculano, Anderson Manoel , *orient.* II. Título

CDD 612.8

ALÓDIA BRASIL COSTA

**ESTUDO ELETRORRETINOGRÁFICO DA ADAPTAÇÃO À LUZ DE
VIAS DE PROCESSAMENTO ESPECÍFICAS DE CONE E DE
OPONÊNCIA EM COR E LUMINÂNCIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Neurociências e Biologia Celular, para a comissão formada pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano (orientador)

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Fernando Allan Farias Rocha (membro titular)

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Mellina Monteiro Jacob (membro titular)

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira (membro titular)

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista (membro suplente)

Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará

Belém
2018

À minha mãe, Ana Angelica Brasil Costa (*in memoriam*), e ao meu pai, Paulo Roberto Navegantes Costa, meus grandes amores, exemplos e incentivadores dos meus estudos a quem dedico todas as minhas vitórias.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por permitir que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, professor Dr. Anderson Manoel Herculano e ao professor Dr Givago da Silva Souza, por serem grandes exemplos de cientistas, despertando minha admiração a cada ideia por sua inteligência, sabedoria e perspicácia que foram essenciais para meu desenvolvimento acadêmico, por todos os ensinamentos, além do bom humor e momentos de descontração que tornaram essa jornada mais prazerosa. Agradeço, também, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de realização de doutorado sanduiche no exterior.

Ao meu supervisor de doutorado sanduiche na Alemanha, Professor Dr. Jan Kremers, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, pelos seus ensinamentos, valiosas discussões e pela honra de conviver com esse renomado pesquisador da área da visão e pessoa maravilhosa.

Aos professores Karen Oliveira, Evander Batista, Fernando Rocha, Adelaide Passos, Mellina Jacob pelas valiosas contribuições para o presente trabalho, pela parceria em outros projetos e pela contribuição na minha formação acadêmica.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (LNE) e da pós graduação em Neurociências e Biologia Celular, em especial Martha Souza, Monica Lima, Luana Leão, Ana Paula Araújo, Tatiana Nascimento, Lucas Luz, Thalita Moura, Glenda Figueira, Natielle Rabelo, Daniele Santana, Allan Malaquias, Isabelle Martins e Kelly Costa pela ajuda que por vezes me prestaram, pela amizade e pelos momentos alegres compartilhados.

Um agradecimento especial à amiga Tayana Carvalho, uma irmã que a vida me deu, que é uma grande parceira, sendo meu “B2” na bancada e na vida. Tivemos a felicidade de irmos para o mesmo país para realizarmos nossos doutorados, assim, eu tive um pedacinho de casa há 7 h de distância. Obrigada por tudo, amiga, pela amizade, pela parceria durante o mestrado e doutorado e na vida pessoal, por tudo que já fizestes por mim e por tudo que és para mim.

Aos membros do departamento de oftalmologia da Universidade Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Erlangen, Alemanha), especialmente Cristiane Martins, Tina Tsai, Avinash Aher, “Frau” Edith Monczak por serem tão solícitos e me ajudarem sempre que precisei.

Agradeço a todos os amigos que fiz em Erlangen que foram essenciais para amenizar a dor da saudade da minha casa, família e amigos, durante o ano que passei na Alemanha, em especial Cristiane Martins, Márcio Ramos, Mariana Ribeiro, Fernanda Paterno, Jéssica Yumi e Graziela Hida. Obrigada pela amizade e por todo o apoio que me deram.

Ao professor Dr. Antônio José de Oliveira Castro pela oportunidade de realização da iniciação científica, na qual me apresentou a pesquisa e a possibilidade de seguir carreira acadêmica, primeiro passo para chegar até aqui.

Ao professor Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira (*in memoriam*) por me receber, ainda durante a graduação, em seu laboratório, pelo prazer de ter lhe conhecido, um grande cientista, pessoa incrível, divertida e inesquecível.

À minha mãe Ana Angelica Brasil Costa (*in memoriam*) pelos ensinamentos e exemplo de garra, caráter, humildade, solidariedade e bom humor que procurei aplicar durante essa jornada acadêmica e que levarei por toda vida. Obrigada, Mãe!

À todos os familiares e amigos que estiveram do meu lado em qualquer etapa dessa jornada, que, por vezes, compreenderam minha ausência e que torceram e torcem pelo meu sucesso em especial meus grandes amores Paulo Navegantes Costa (pai), Igor e Vlória Brasil Costa (irmãos), Maída e Iluska Souza (tias).

À Universidade Federal do Pará, que é minha segunda casa há 11 anos.

Ao programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular.

À CAPES, CNPQ e ao Programa Ciências sem Fronteiras, pelo suporte financeiro.

RESUMO

O sistema visual apresenta uma função essencial denominada adaptação à luz ou adaptação fotópica que consiste na regulação da sensibilidade à luz permitindo adaptação visual a ampla faixa de níveis de iluminação. Esse fenômeno não está totalmente elucidado. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a magnitude e padrão temporal da variação das respostas elétricas da retina para estímulos seletivos à cone L e à cone M e para estímulos específicos da via de luminância e da via de cor vermelho-verde, possibilitando a avaliação da atividade das vias visuais parvocelular vermelho-verde (via P) e magnocelular (via M), durante a adaptação à luz. Para tal, 6 sujeitos saudáveis foram submetidos a 30 minutos de adaptação ao escuro e em seguida a um campo constante de adaptação à luz por 16 min. Os estímulos foram dados a cada 2 min e registrada a resposta elétrica da retina por eletrorretinograma de campo total (ffERG) ao longo dos 16 min. Foi utilizada a técnica de tripla substituição silenciosa para isolamento das respostas das vias originadas nos cones L ou M. Também foram utilizados estímulos específicos de luminância (Lum) e de cor vermelho-verde (Crom). Para cada tipo de estimulação utilizou-se frequências temporais intermediária (12 Hz, que reflete a atividade da via P) e alta (36 Hz, que reflete a atividade da via M) resultando em 8 condições de estimulação. Amplitude e fase dos componentes primeiro (F), segundo (2F) e terceiro harmônico (3F) foram extraídas por Transformada Rápida de Fourier. Observou-se que amplitude e fase aumentaram ao longo do tempo de adaptação à luz com formas de onda senoidais simples na maioria dos componentes e condições de estimulação. Os aumentos relativos de amplitude de F nas respostas conduzidas por cone M durante a adaptação à luz foram maiores do que nas conduzidas por cone L em ambas as frequências temporais, 12 Hz (M= 1,21; L= 0,33) e 36 Hz (M= 1,94; L= 0,55), assim como foram maiores em 36 Hz que em 12 Hz para os dois cones. Em geral, houve leve aumento de fase de F durante o tempo de adaptação à luz (< 30 graus), levemente maiores em 36 Hz. Quanto à cinética de adaptação à luz, amplitude e fase de F que parecem refletir a atividade da via P apresentaram adaptação mais rápida (Cone L 12 Hz, Cone M 12 Hz, Crom 12 Hz, Lum 12, com média de 1,4 min) e aquelas que provavelmente refletem atividade da via M apresentaram adaptação mais lenta (Lum 36 Hz, Cone L 36 Hz, Cone M 36 Hz, com média de 4,9 min). Assim, via M e P apresentaram distintas magnitude e cinética de adaptação à luz, sendo a via M a via de maior aumento e mais lenta adaptação.

Palavras-chave: adaptação à luz, eletrorretinograma de campo total, cone L, cone M, via magnocelular, via parvocelular.

ABSTRACT

Visual system has an essential function called light adaptation or photopic adaptation, which consists in the regulation of light sensitivity allowing visual adaptation to a wide range of illumination levels. This phenomenon is not fully elucidated. Therefore, the present study aims to evaluate the magnitude and temporal pattern of the variation of retinal electrical responses for L cone and M cone selective stimuli and for luminance pathway and red-green color pathway specific stimuli, making possible the evaluation of the red-green parvocellular (P pathway) and magnocellular (M pathway) visual pathways activity, during the photopic adaptation. For such purpose, 6 healthy subjects underwent 30 minutes of dark adaptation and then were exposed a light steady background for 16 min. The stimuli were given every 2 min and the electrical retinal response was recorded by full field electroretinogram (ffERG) over 16 min. The triple silent substitution method was used to isolate the responses of pathways originating from the L or M cone. We also used specific stimuli of luminance (Lum) and red-green color (Crom). For each stimulation type was used intermediate (12 Hz, which reflects the activity of the red-green parvocellular pathway - P pathway) and high (36 Hz, which reflects the activity of the magnocellular pathway - M pathway) temporal frequency, resulting in 8 stimulation conditions. Amplitude and phase of the first (F), second (2F) and third (3F) harmonic components were extracted by Fast Fourier Transform. It was observed that amplitude and phase increased over light adaptation time with simple sine wave form in the most of components and stimulation conditions. The relative increases in F amplitude from the M-cone driven responses during the light adaptation were higher than those L-cone driven ERGs at both temporal frequencies, 12 Hz (M = 1.21, L = 0.33) and 36 Hz (M = 1.94, L = 0.55), as well as they were higher at 36 Hz than at 12 Hz for the two cones. In general, there was slight F phase increase during the light adaptation time (<30 degrees), slightly higher at 36 Hz. Regarding the light adaptation kinetics, F amplitude and phase that seem reflect the activity of the P pathway presented a faster adaptation (L-cone 12 Hz, M-cone 12 Hz, Crom 12 Hz, Lum 12, with a mean of 1.4 min) and those that probably reflect activity of the M-pathway had slower adaptation (Lum 36 Hz, L-cone 36 Hz, M-cone 36 Hz, with a mean of 4.9 min). Therefore, M and P pathways presented different magnitude and kinetics of light adaptation, being the M pathway the pathway of greatest increase and slower adaptation.

Keywords: light adaptation, full field electroretinogram, L- cone, M-cone, magnocellular pathway, parvocellular pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomia do olho humano.	18
Figura 2.	Acomodação visual.	20
Figura 3.	Representação esquemática da citoarquitetura da retina.	22
Figura 4.	Representação esquemática da estrutura de bastonetes e cones.	24
Figura 5.	Distribuição de cones e bastonetes na retina e suas linhas exclusivas e convergentes de transmissão de sinal.	28
Figura 6.	Curva de sensibilidade espectral dos fotorreceptores.	29
Figura 7.	Distribuição de cones S, M e L em diferentes áreas da retina.	30
Figura 8.	Tipos de células bipolares da retina de primatas.	32
Figura 9.	Conexões entre o terminal sináptico dos fotorreceptores e as células bipolares e horizontais.	34
Figura 10.	Representação esquemática da ativação das células bipolares <i>ON</i> e <i>OFF</i> .	37
Figura 11.	Morfologia e campo receptivo de células ganglionares M (parasol), P (<i>midget</i>) e K (biestratificada).	41
Figura 12.	Vias visuais paralelas na retina.	43
Figura 13.	Vias paralelas da retina ao córtex.	45
Figura 14.	Correntes extracelulares geradas em resposta a estímulo luminoso no eletrorretinograma.	48
Figura 15.	Formas de ondas obtidas pelo eletrorretinograma de campo total.	50
Figura 16.	Exemplo do tipo de estimulação utilizada no método de substituição silenciosa.	53
Figura 17.	Cena visual representativa do processo de adaptação à luz.	55

Figura 18.	Adaptação à luz no eletrorretinograma de campo total por PEACHEY; ALEXANDER; FISHMAN, 1991.	57
Figura 19.	Aumento de amplitude do eletrorretinograma multifocal durante a adaptação à luz por KONDO et al., 1999.	59
Figura 20.	Mudanças nos componentes harmônicos do <i>flicker</i> no eletrorretinograma durante a adaptação à luz.	61
Figura 21.	Representação dos quatro diferentes tipos de estimulação utilizadas nos experimentos.	67
Figura 22.	Posicionamento dos eletrodos.	69
Figura 23.	Média das formas de onda dos registros individuais para respostas à estímulos de isolamento de cone L e M em 12 Hz e 36 Hz, durante 16 min de adaptação à luz.	73
Figura 24.	Média das formas de onda dos registros individuais para respostas à estímulos de isolamento de mecanismo cromático e de luminância em 12 Hz e 36 Hz, durante 16 min de adaptação à luz.	74
Figura 25.	Média de distribuição de amplitude dos harmônicos para respostas à estímulo de isolamento de cone L e M em 12 Hz e 36 Hz, ao longo de 16 minutos de adaptação à luz.	76
Figura 26.	Média de distribuição de amplitude dos harmônicos para respostas à estímulo de isolamento de mecanismo cromático e de luminância em 12 Hz e 36 Hz, ao longo de 16 minutos de adaptação à luz.	77
Figura 27.	Variação de amplitude da resposta eletrorretinográfica ao <i>flicker</i> de isolamento de cone L em função do tempo de adaptação à luz.	80
Figura 28.	Variação de amplitude da resposta eletrorretinográfica ao <i>flicker</i> de isolamento de cone M em função do tempo de adaptação à luz.	81
Figura 29.	Variação de amplitude da resposta eletrorretinográfica ao <i>flicker</i> de isolamento de mecanismo cromático em função do tempo de adaptação à luz.	82

- Figura 30.** Variação de amplitude da resposta eletrorretinográfica ao *flicker* de isolamento de mecanismo de luminância em função do tempo de adaptação à luz. 83
- Figura 31.** Variação de fase da resposta eletrorretinográfica ao *flicker* de isolamento de cone L em função do tempo de adaptação à luz. 85
- Figura 32.** Variação de fase da resposta eletrorretinográfica ao *flicker* de isolamento de cone M em função do tempo de adaptação à luz. 86
- Figura 33.** Variação de fase da resposta eletrorretinográfica ao *flicker* de isolamento de mecanismo cromático em função do tempo de adaptação à luz. 87
- Figura 34.** Variação de fase da resposta eletrorretinográfica ao *flicker* de isolamento de mecanismo de luminância em função do tempo de adaptação à luz. 88
- Figura 35.** Razão de amplitude de cone L/M à 12 e 36 Hz durante a adaptação à luz. 94
- Figura 36.** Diferença de fase de cone L-M à 12 e 36 Hz durante a adaptação à luz. 95
- Figura 37.** Variação de amplitude (gráfico superior) e fase (gráfico inferior) do primeiro harmônico (F) em função da constante de tempo de adaptação à luz. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Condições de estimulação.	66
Tabela 2.	Variação (<i>a</i>) média de amplitude e fase (graus) dos componentes F, 2F e 3F durante a adaptação à luz para cada tipo de resposta eletrorretinográfica analisada.	89
Tabela 3.	Constante de tempo média (min) de amplitude e fase dos componentes F, 2F e 3F, durante a adaptação à luz para cada tipo de resposta eletrorretinográfica analisada.	92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ARVO: Association for Research in Vision and Ophtalmology

Célula M: célula ganglionar parasol

Célula P: célula ganglionar *midget*

Célula K: célula ganglionar biestratificada

CIE: Comissão internacional de iluminação

DTL: Eletrodo tipo Dawson, Trick e Litzkow

ERG: Eletrorretinograma

ffERG: Eletrorretinograma de campo total

F: primeiro harmônico

2F: segundo harmônico

3F: terceiro harmônico

GMPC: Guanosina Monofosfato Cíclica

ISCEV: Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Visual Clínica

K⁺: Íon potássio

LED: Diodo emissor de luz

mfERG: Eletrorretinograma multifocal

Na⁺: Íon sódio

NGL: Núcleo Geniculado Lateral

PDE: Fosfodiesterase

FFT: Transformada rápida de Fourier

SNR: Signal to Noise Ratio (razão sinal-ruído)

RB: células bipolares de cone e um de bastonete

OPL: Camada plexiforme externa

INL: Camada nuclear interna

IPL: Camada plexiforme interna

GCL: Camada de célula ganglionar

DB1–DB6: Célula bipolar de cone difusa tipo 1 a 6

FMB: Célula bipolar de cone anãs ou *midget* plana

IMB: Célula bipolar de cone anãs ou *midget* invaginante

BB: Célula bipolar de cone S

RB: Célula bipolar de bastonete

SNC: Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OLHO	17
1.2	ESTRUTURA E FUNÇÃO DA RETINA E VIAS RETINO-GENICULADO-CORTICAL.....	21
1.3	ELETORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL (ffERG)	46
1.3.1	Estimulação seletiva de cones L e M e das vias pós-receptorais magnocelular e parvocelular.....	51
1.4	FENÔMENO DE ADAPTAÇÃO À LUZ.....	54
2	OBJETIVOS.....	62
2.1	OBJETIVO GERAL.....	62
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	62
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3.1	SUJEITOS.....	63
3.2	ESTÍMULOS VISUAIS.....	64
3.3	REGISTROS ELETORRETINOGRÁFICOS.....	68
3.4	PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	70
4	RESULTADOS	72
4.1	FORMAS DE ONDA E ESPECTRO DE ENERGIA.....	72
4.2	VARIAÇÃO DE AMPLITUDE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO À LUZ.....	78
4.3	VARIAÇÃO DE FASE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO À LUZ.....	84
4.4	ANÁLISE DAS CONSTANTES DE TEMPO DE ADAPTAÇÃO À LUZ.....	90

4.5	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS CONSIDERANDO A CONTRIBUIÇÃO DAS VIAS MAGNOCELULAR (M) E PARVOCELULAR (P) NA ADAPTAÇÃO À LUZ.....	93
5	DISCUSSÃO	97
6	CONCLUSÃO	101
7	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	102
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
	ANEXO 1: RESUMO DO TRABALHO “THE LIGHT ADAPTATION PHENOMENON IN HUMAN: RECEPTORAL AND POST-RECEPTORAL INVOLVEMENT” PUBLICADO NOS ANAIS DO EVENTO “REUNIÃO ANUAL DA ARVO 2016 (ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY)” REALIZADO DE 1 A 5 DE MAIO DE 2016, SEATTLE, WA, ESTADOS UNIDOS.....	109

1. INTRODUÇÃO

A visão é um dos principais sentidos dos humanos, haja vista que desempenha diversas funções, como localização espaço-temporal de objetos, fornecimento de informações visuais importantes para a propriocepção, locomoção, cognição e memória, importantes para a sobrevivência dos indivíduos (SQUIRE et al., 2008).

A classificação e interpretação das cenas do ambiente envolvem mecanismos extremamente complexos que vão da absorção da luz nos olhos ao processamento cerebral das informações gerando complexas distintas percepções de cor, contraste, profundidade, textura e movimento, permitindo a detecção de velocidade e distância dos objetos, a identificação de alimentos, membros de outras espécies e membros conhecidos e não conhecidos da mesma espécie. Essa complexidade do sistema visual o tornou o sistema mais estudado em neurociência sensorial (SQUIRE et al., 2008).

Em adição às diversas funções do sistema visual, tem-se a essencial função de adaptação à luz ou adaptação fotópica, fenômeno que consiste em mudanças na sensibilidade à luz que nos permite adaptar a uma ampla faixa de níveis de iluminação. A variação da iluminação do ambiente do escuro para luminosidade intensa ativa diferentes mecanismos, incluindo fotorreceptores e vias pós receptorais paralelas gerando mudanças na sensibilidade à luz para, assim, mudar de um estado de ofuscamento instantâneo para um estado adaptado ao claro retomando a acuidade adequada da cena visual (ARMINGTON; BIERSDORF, 1958, GOURAS; MACKAY, 1989, PEACHEY et al., 1989; MURAYAMA; SIEVING, 1992; BENOIT; LACHAPELLE, 1995, ALEXANDER et al., 2006).

Esse fenômeno tem sido avaliado por eletrorretinograma de campo total (registro da atividade elétrica da retina) através do qual pode se observar uma propriedade de aumento de amplitude de diversos componentes das respostas da retina em função do tempo de adaptação ao claro (ARMINGTON; BIERSDORF, 1958, GOURAS; MACKAY, 1989, PEACHEY et al., 1989; MURAYAMA; SIEVING, 1992; BENOIT; LACHAPELLE, 1995, ALEXANDER et al., 2006).

O estudo do fenômeno de adaptação à luz exige um conhecimento prévio da fisiologia visual em que a primeira etapa ocorre no olho, quando a luz atravessa a córnea até a retina, onde ocorre a captação e transformação de energia luminosa em sinais neurais pelos fotorreceptores (DACEY, 2000; WÄSSLE, 2004). Esses sinais são transmitidos para as células bipolares e horizontais, em seguida, para as células amácrinas e ganglionares. Estas geram um potencial de

ação, o qual é conduzido pelo nervo óptico (formados pelos axônios das células ganglionares) e transmitido para o núcleo geniculado lateral (NGL) e, posteriormente, para o córtex visual (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; KIPER, 2003; WÄSSLE, 2004; NASSI; CALLAWAY, 2009).

Essa cascata de transmissão se dá de forma segregada em diferentes vias da retina ao córtex visual, passando pelo NGL (vias retino-geniculado-cortical) denominadas magnocelular, parvocelular e koniocelular. A via magnocelular conduz informações acromáticas de luminância das cenas visuais do ambiente. Já as vias parvocelular e koniocelular são vias cromáticas, que conduzem informações de cor do ambiente (DACEY, 1999; MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004; CALLAWAY, 2005; NASSI; CALLAWAY, 2009).

Além da especificidade das vias pós receptorais os diferentes tipos de fotorreceptores do tipo cones também apresentam peculiaridade que consiste na diferença na absorção espectral sendo o cone S mais sensível a luz com comprimento de onda curto com pico de absorção espectral em aproximadamente 420 nm (correspondentes à cor azul), o cone M mais sensível a luz com comprimento de onda médio com pico de absorção espectral em aproximadamente 535 nm (correspondentes à cor verde) e o cone L mais sensível a luz com comprimento de onda longo 565 nm (correspondentes à cor vermelha) (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; KIPER, 2003).

Compreender a participação e dinâmica dos diferentes tipos de fotorreceptores cone, como cone L e M, e das vias visuais pós-receptorais paralelas magnocelular e parvocelular (cujas respostas podem ser isoladas usando técnicas eletrorretinográficas específicas) nesse fenômeno em sistemas visuais normais é de grande importância para melhor compreensão do fenômeno de adaptação à luz. Ressalta-se também a grande relevância clínica visando a possibilidade de estudar variações no padrão de normalidade da adaptação à luz em diferentes doenças que afetam exclusiva ou preferencialmente uma via pós receptoral ou um tipo de cone.

1.1 OLHO

A primeira etapa da visão ocorre no olho, quando a luz atravessa a córnea até a retina (SQUIRE et al., 2008). O olho humano é composto por diversas estruturas anatômicas apresentadas na figura 1.

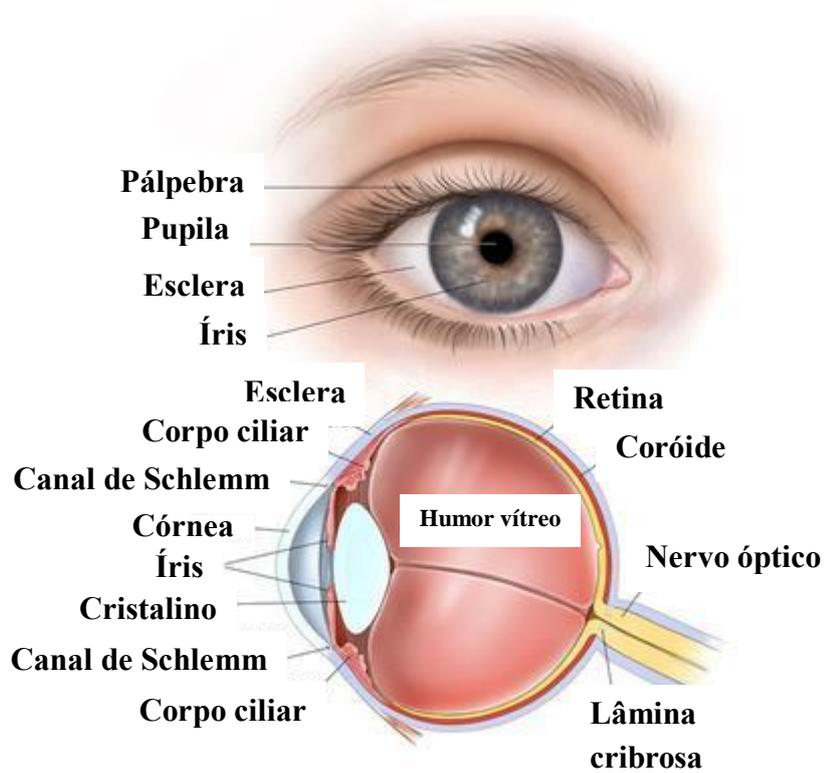


Figura 1. Anatomia do olho humano (Adaptado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022375/> Acesso em 07/04/2017).

As propriedades refrativas do olho são determinadas pela curvatura da córnea e do cristalino, lentes responsáveis pela focalização de uma imagem invertida na retina. A córnea possui curvatura fixa, ao passo que a curvatura do cristalino é ajustada por músculos lisos do corpo ciliar para focalização da imagem, processo denominado acomodação visual (figura 2). Os músculos do corpo ciliar relaxam (achatando o cristalino, reduzindo sua curvatura) quando o objeto encontra-se distante ou contraem (aumentando a curvatura do cristalino) quando o objeto encontra-se próximo, assim, os objetos distantes e próximos ao observador permanecem em foco na retina (SQUIRE et al., 2008; LENT, 2010).

Outra função importante do olho é controlar a quantidade de luz que chega à retina através do reflexo pupilar. Essa função é desempenhada pela íris e pupila, orifício situado no centro da íris. Em ambientes com intensidade luminosa alta, muito claros, a pupila se contrai (fenômeno denominado miose), tem seu diâmetro diminuído, para que não chegue à retina uma quantidade excessiva de luz permitindo a entrada de apenas a quantidade de luz necessária para a formação da imagem, evitando, assim, ofuscações e “borramentos”. Já em ambientes escuros, a pupila dilata (midríase), tem seu diâmetro aumentado, maximizando a quantidade de luz que chega à retina, auxiliando, desse modo, na adaptação a diversos níveis de iluminação (SQUIRE et al., 2008; LENT, 2010).

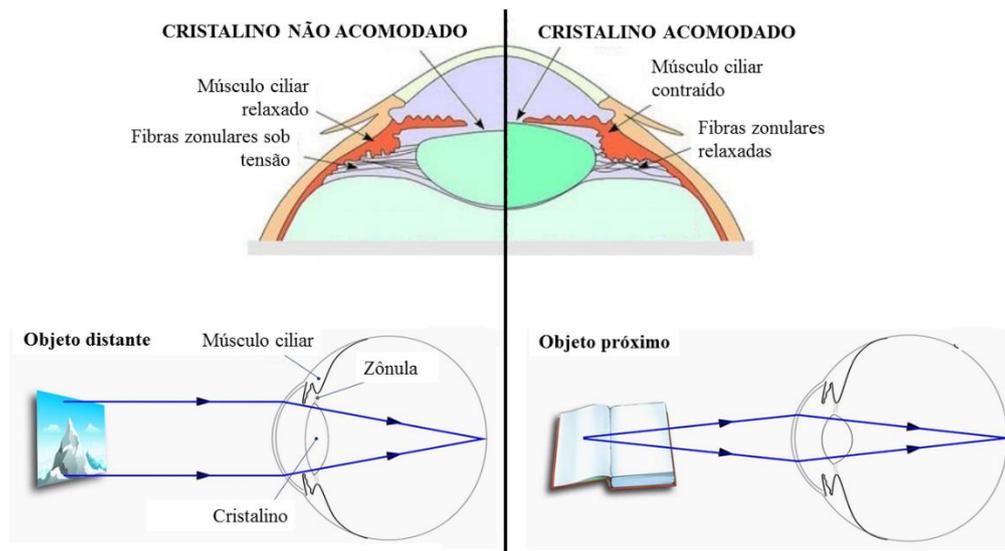


Figura 2. Acomodação visual. No olho não acomodado (à esquerda), o cristalino é mantido na forma achatada por fibras zonulares sob tensão. Quando o objeto se aproxima do observador o músculo ciliar contrai e as fibras zonulares relaxam, o que torna o cristalino mais arredondado com um raio de curvatura maior na superfície anterior. Adaptado de PETRASH, 2013 http://cmapspublic3.ihmc.us/rid=1291100567448_739603365_22532/Recursos%20para%20Presbicia%20de%20Guadalupe%20Nava Acesso em 24/04/2017).

1.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA RETINA E VIAS PARALELAS RETINO-GENICULADO-CORTICAL

Os primeiros estágios do processamento visual neural ocorrem na retina. A retina é uma fina camada de tecido nervoso localizada na parte posterior do olho (figura 1), é parte do Sistema Nervoso Central (SNC) e responsável pela captação e transformação de sinais luminosos em sinais neurais, processo denominado fototransdução e iniciado a partir da absorção de luz (fótons) pelos fotorreceptores (KOLB, 2003; PURVES et al., 2004; WÄSSLE, 2004).

Os principais tipos celulares da retina de mamíferos são fotorreceptores bastonetes e cones, células bipolares, células horizontais, células ganglionares e células amácrinas, dispostos em camadas laminares da seguinte forma, da camada mais externa para a mais interna: (1) camada de segmentos externos dos fotorreceptores que encontram-se imersos no epitélio pigmentado (o qual promove a nutrição dos fotorreceptores e contínua reciclagem dos segmentos externos e regeneração do fotopigmento); (2) camada nuclear externa, a qual possui os corpos celulares dos fotorreceptores; (3) camada plexiforme externa, onde os fotorreceptores estabelecem sinapses com as células bipolares e horizontais; (4) camada nuclear interna, a qual contém os corpos celulares das células horizontais, bipolares, amácrinas e núcleo das células de *Müller*; (5) camada plexiforme interna, onde as células bipolares e amácrinas estabelecem contato sináptico com as células ganglionares; (6) camada de células ganglionares; (7) camada de fibra do nervo óptico. A citoarquitetura da retina é apresentada na figura 3 (KOLB, 2003; PURVES et al., 2004; WÄSSLE, 2004).

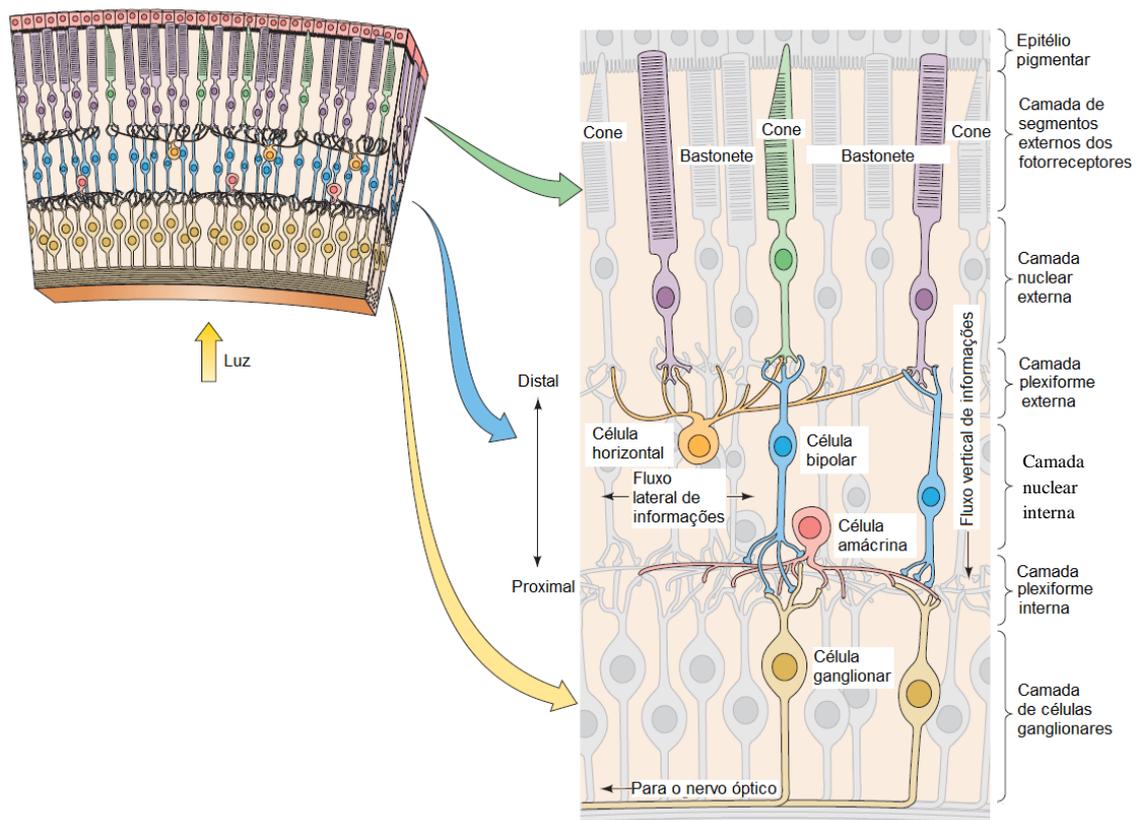


Figura 3. Representação esquemática da citoarquitetura da retina. À esquerda é apresentada a direção que a luz entra na retina, atravessando as diversas camadas até os fotorreceptores e à direita os variados tipos celulares e camadas que compõem a retina (Adaptado de PURVES et al., 2004).

A retina de vertebrados contém dois tipos de fotorreceptores, os bastonetes e os cones, responsáveis pelo largo espectro de absorção luminosa do sistema visual que vai desde poucos fótons, em ambientes escuros, até mais de 10^{14} fótons por segundo em um dia ensolarado (SQUIRE et al., 2008).

Os fotorreceptores são divididos morfológicamente em: segmento externo, segmento interno, corpo celular e terminais sinápticos (figura 4). O segmento interno é separado do segmento externo por um estrangulamento na membrana chamado cílio de ligação. O segmento interno continua-se com o corpo celular (onde localiza-se o núcleo) e a terminação sináptica. Nos cones a terminação sináptica designa-se por pedículo, é grande, cônica, com uma porção terminal achatada e nos bastonetes, designam-se por esférulas e são pequenas porções alargadas da terminação dos axônios (ANDERSON; FISHER, 1976; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

O segmento externo dos fotorreceptores contém discos membranosos (dobras na membrana celular), como mostra a figura 4, que absorvem a luz devido à presença de fotopigmento, uma proteína receptora sensível à luz, rodopsina (presente nos bastonetes) ou opsina (presente nos cones). A rodopsina é uma proteína transmembrana que possui um grupo prostético, retinal ou retinaldeído, extremamente importante no processo de conversão da energia luminosa em sinal elétrico (DACEY, 2000; MASLAND, 2001; KOLB, 2003; GUYTON; HALL, 2011; WANG; KEFALOV, 2011).

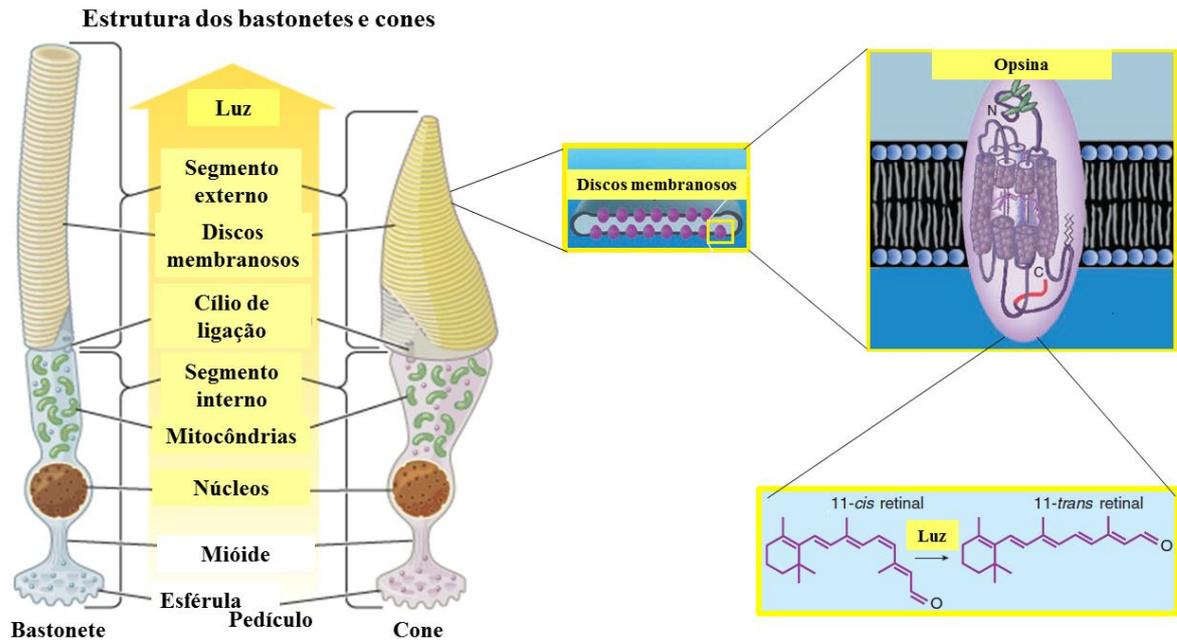


Figura 4. Representação esquemática da estrutura de bastonetes e cones. Em destaque os discos membranosos presentes nos segmentos externos dos fotorreceptores que contém fotopigmento (opsina), proteína de membrana que contém a molécula 11-cis retinal, derivado da vitamina A, que absorve o fóton gerando mudança da forma cis do retinal para forma trans (Adaptado de <https://global.britannica.com/science/rhodopsin> e KOLB, 2003. Acesso em: 23/04/2014).

Após atravessar toda a retina a luz chega até a camada dos fotorreceptores na qual ocorre ativação do pigmento fotossensível, rodopsina ou opsina, presente nos segmentos externos dos fotorreceptores, sendo esse o primeiro passo da fototransdução. Os fotopigmentos são a combinação da proteína escotopsina (nos bastonetes) e fotopsina (nos cones) com o cromóforo (molécula que efetivamente absorve o fóton) 11-cis retinal, derivado da vitamina A e contido entre as hélices da opsina. Quando a energia luminosa é absorvida pela rodopsina ocorre mudança da forma cis do retinal para forma trans (figura 4), que provoca uma cascata de eventos moleculares que resultam na hiperpolarização graduada do fotorreceptor necessária para transmissão da imagem visual (KOLB, 2003; PURVES et al., 2004; GUYTON; HALL, 2011; WANG; KEFALOV, 2011).

Nos fotorreceptores, a codificação da informação luminosa se dá através da transdução da quantidade de fótons absorvidos pelos fotopigmentos em magnitudes de variações graduadas do potencial de membrana do fotorreceptor. Essas células funcionam como contadores dos fótons absorvidos, ou seja, do número de eventos de absorção de fótons pelos fotopigmentos o que provoca a fotoisomerização desses fotopigmentos ativando a cascata de fototransdução, o impulso nervoso é, então, propagado através das camadas da retina, do núcleo geniculado lateral (NGL), localizado na região dorsolateral do tálamo, e do córtex visual (LAMB; PUGH, 1992; NASSI; CALLAWAY, 2009).

Os fotorreceptores cones e bastonetes possuem diferenças morfológicas e funcionais. Os bastonetes apresentam segmento externo alongado com muitos discos membranosos, o fotopigmento presente é a rodopsina, têm alta sensibilidade à luz com baixo limiar de ativação, sendo capaz de detectar um único fóton e tem sua atividade saturada em condições moderadas de luminosidade (ANDERSON; FISHER, 1976; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

Os bastonetes possuem lenta resolução temporal, ou seja, não são eficientes na detecção de objetos em movimento rápido. Por esse motivo são desativados quando o indivíduo é submetido a estímulos visuais de alta frequência temporal (TAKEUCHI; DE VALOIS, 2000). Atuam principalmente na visão escotópica ou noturna (em baixas condições de iluminação) e acromática com pico de absorção espectral em aproximadamente 498 nm (figura 6) (ANDERSON; FISHER, 1976; FU; YAU, 2007). Esses fotorreceptores ligam-se às células bipolares em um sistema que converge nas células ganglionares, ou seja, vários bastonetes se ligam a uma única célula bipolar (figura 5 B). Esse sistema convergente de transmissão da informação é responsável pela baixa acuidade visual (na detecção de formas e discriminação de detalhes das cenas visuais) e baixa resolução temporal, características desses fotorreceptores (ANDERSON; FISHER, 1976; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

Os cones, por sua vez, contêm o fotopigmento opsina e apresentam segmento externo em forma cônica, mais curto e estreito, são menos sensíveis à luz, sendo necessários mais fótons para ativá-los, ou seja, são ativados em intensidade de iluminação superior à que ativa os bastonetes (ANDERSON; FISHER, 1976). Dessa forma, os cones atuam principalmente na visão fotópica ou diurna e visão de cores. Têm maior resolução temporal, sendo mais adequados na detecção de objetos em movimento e estímulos de alta frequência temporal. Na região central da retina há uma depressão chamada fóvea que contém quase exclusivamente fotorreceptores cones cada um ligado a uma única célula bipolar que se liga a apenas uma célula ganglionar, formando um sistema de linhas exclusivas (figura 5 A e B). Esse sistema de linhas exclusivas dos cones resulta em alta acuidade visual e excelente discriminação de formas e detalhes finos na fóvea (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

Assim, quanto à distribuição de fotorreceptores na retina de primatas, os bastonetes ocupam principalmente a periferia da retina e cones o centro (figura 5 A e C) (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; KIPER, 2003).

Os cones são classificados de acordo com a região do espectro de luz com maior probabilidade de excitar seu fotopigmento, ou seja, cada tipo de cone possui opsinas mais sensíveis a um comprimento de onda específico dentro de uma faixa de comprimentos de onda de 400 a 700 nm que corresponde a uma estreita faixa de radiação eletromagnética, entre 430×10^{12} a 750×10^{12} Hz, aproximadamente, faixa a qual o sistema visual humano é sensível (NASSAU, 2001).

A partir dessa classificação, a retina de humanos e primatas do velho mundo tricromatas contém 3 tipos de cones: cones S (*short wavelength sensitive*); cones M (*middle wavelength sensitive*); cones L (*long wavelength sensitive*), sensíveis a curto, médio e longo comprimento de onda, com pico de absorção espectral em aproximadamente 420 nm (correspondentes à cor azul), 535 nm (correspondentes à cor verde) e 565 nm (correspondentes à cor vermelha), respectivamente, como apresentado na figura 6 (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; KIPER, 2003).

Quanto à densidade celular, a retina de primatas é bastonete dominante, contendo aproximadamente 95% de bastonete e 5% de cones (WANG; KEFALOV, 2011). A distribuição dos diferentes tipos de cones na retina é randômica havendo considerável variação na quantidade relativa de cones L e M entre indivíduos, assim como na razão L: M em toda a retina, podendo variar entre 0,4 a mais de 10 (ROORDA; WILLIAMS, 1999; HOFER et al., 2005; CHALLA et al., 2010). Já os cones S, na maioria dos primatas, representam apenas 5 a 15% da população total de cones, localizados principalmente na retina central perifoveal (LEE;

MARTIN; GRÜNERT, 2010). Apesar da variação do mosaico de cones (figura 7) não há diferenças perceptíveis na visão de cores entre indivíduos tricromatas (KREMERS et al., 2000; CHALLA et al., 2010).

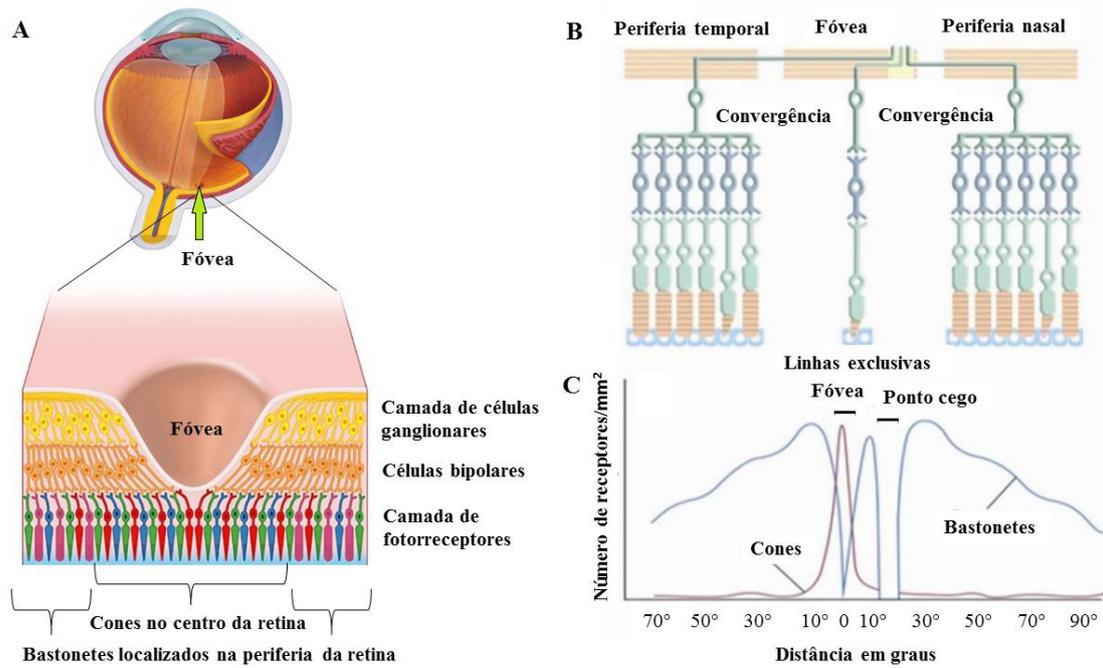


Figura 5. Distribuição de cones e bastonetes na retina e suas linhas exclusivas e convergentes de transmissão de sinal. Em A é apresentada a localização e estrutura da fóvea. Em B são mostradas as linhas exclusivas de cones (em que a razão cone e célula ganglionar é 1:1) e convergentes de bastonetes (em que uma célula ganglionar pode receber sinal de vários bastonetes) de transmissão da informação dos fotorreceptores na retina. Em C a distribuição de cones e bastonetes na retina (Adaptado de LENT, 2010).

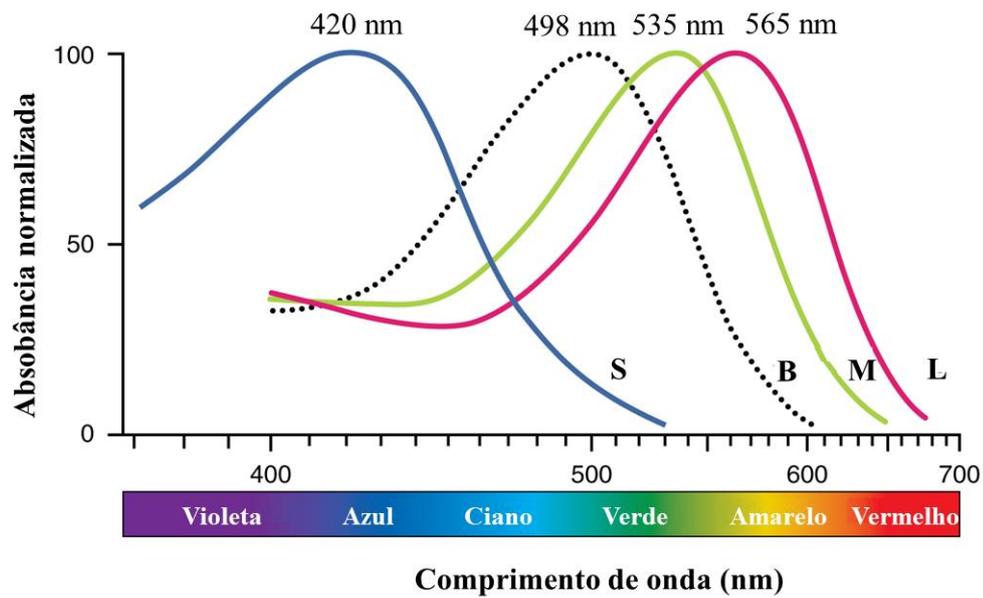


Figura 6. Curva de sensibilidade espectral dos fotorreceptores. Bastonetes (B), Cones S (S), Cones M (M) e Cones L (L). Os valores acima de cada curva correspondem ao pico de absorção de cada fotorreceptor (Adaptado de http://oerpub.github.io/epubjs-demo-book/resources/1416_Color_Sensitivity.jpg. Acesso em 17/08/2017).

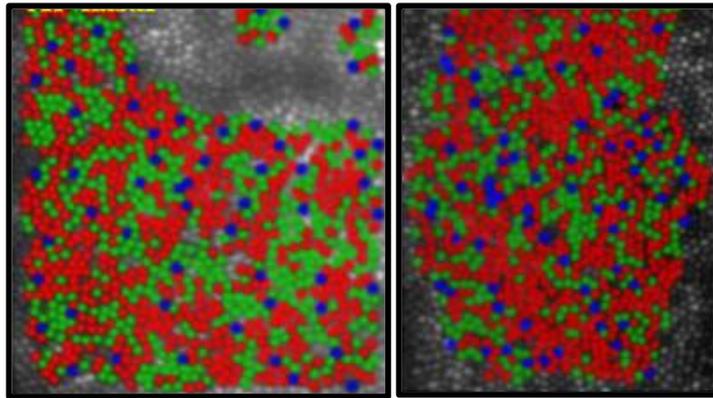


Figura 7. Distribuição de cones S, M e L em diferentes áreas da retina. As imagens são coloridas artificialmente mostrando cones S (em azul), M (em verde) e L (em vermelho). À esquerda é apresentada uma imagem da retina nasal e à direita é apresentada uma imagem da retina temporal, ambas obtidas do mesmo sujeito (Adaptado de HOFER et al., 2005).

As células bipolares também se apresentam em diferentes tipos, sendo classificadas de acordo com diversos parâmetros. (1) quanto ao fotorreceptor do qual recebe informação: células bipolares de cone ou células bipolares de bastonete; (2) quanto à resposta ao neurotransmissor glutamato: células bipolares em ON ou OFF; (3) quanto à morfologia e via pós-receptoral a qual pertencem: células bipolares de cone difusas, anãs ou *midget* e bipolar de cone S. (BOYCOTT; WÄSSLE, 1991; EULER, SCHNEIDER; WÄSSLE, 1996; DACEY, 1999; DACEY, 2000; MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004).

As células bipolares de cone e de bastonetes apresentam-se na proporção de 50% cada na retina de primatas. As células bipolares são, também, classificadas com base no padrão das ramificações e no nível da estratificação das terminações dos axônios na camada plexiforme interna, apresentando 11 tipos morfolologicamente diferentes de células bipolares de cone e apenas um tipo de célula bipolar de bastonete como mostra a figura 8. Os terminais das células bipolares OFF encontram-se na parte mais distal e os terminais ON na parte mais proximal (DACEY, 1999; WÄSSLE, 2004).

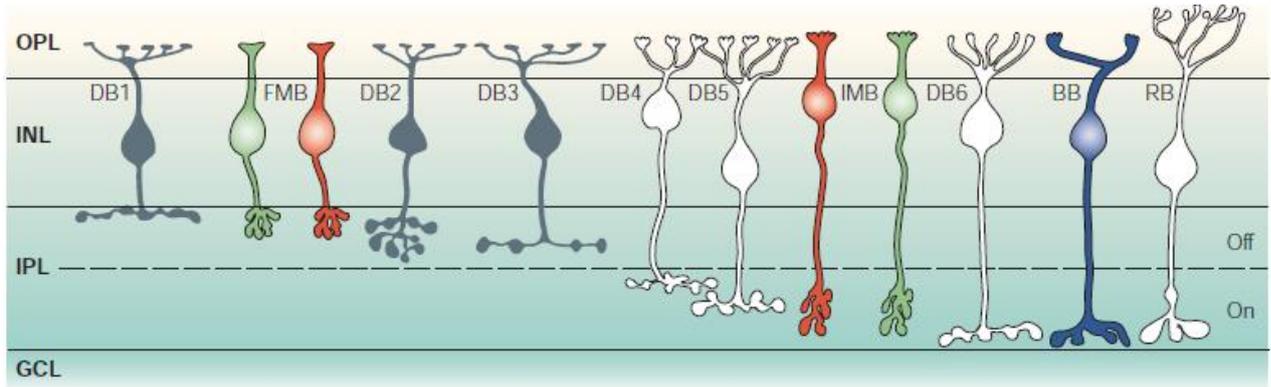


Figura 8. Tipos de células bipolares da retina de primatas. A imagem mostra 11 tipos morfológicamente diferentes de células bipolares de cone e um de bastonete (RB). O nível de estratificação das terminações dos axônios na camada plexiforme interna define o tipo de célula bipolar em tipo On e Off. OPL: Camada plexiforme externa; INL: Camada nuclear interna; IPL: Camada plexiforme interna; GCL: Camada de célula ganglionar; DB1–DB6: Célula bipolar de cone difusa; FMB: Célula bipolar de cone anã ou *midget* plana. IMB: Célula bipolar de cone anã ou *midget* invaginante. BB: Célula bipolar de cone S. RB: Célula bipolar de bastonete (Adaptado de WÄSSLE, 2004).

Essa classificação das células bipolares em ON ou OFF se dá de acordo com as respostas ao neurotransmissor glutamato liberados pelos fotorreceptores da seguinte forma: células bipolares do tipo *ON* possuem receptores metabotrópicos de glutamato mGluR6 (receptor associado a proteína G que exerce seus efeitos através da ativação enzimática), hiperpolarizam na presença e despolarizam na ausência de glutamato, ou seja, são ativadas pelo aumento da intensidade luminosa e células bipolares do tipo *OFF* possuem receptores ionotrópicos de glutamato AMPA e cainato (receptor que exerce seus efeitos através da modulação da atividade de canal iônico), despolarizam na presença de glutamato e hiperpolarizam na sua ausência, ou seja, respondem à diminuição da intensidade luminosa, em outras palavras, as células bipolares *OFF* são hiperpolarizadas pela luz e as bipolares *ON* despolarizadas. As células bipolares de bastonete são todas do tipo *ON* ao passo que metade das células bipolares de cones são tipo *ON* e a outra metade são tipo *OFF* (BOYCOTT; WÄSSLE, 1991; EULER, SCHNEIDER; WÄSSLE, 1996; DACEY, 2000; MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004).

A resposta elétrica das células bipolares *ON* e *OFF* pode ser sustentada (tônica) ou transitória (fásica) a um estímulo luminoso constante. O tipo de resposta possivelmente é determinado pelas taxas de recuperação dos receptores de glutamato após sua estimulação por esse neurotransmissor e sua dessensibilização (AWATRAMANI; SLAUGHTER, 2000).

As células bipolares *ON* e *OFF* também apresentam peculiaridades quanto à conexão com os cones sendo invaginantes e não invaginante, respectivamente. Os dendritos das células bipolares *ON* de cone, assim como das células horizontais, se inserem nas invaginações dos pedículos de cone (terminal sináptico de cones) onde são formadas as sinapses denominadas tríades. Já os dendritos de células bipolares *OFF* de cone formam contatos na base do pedículo do cone (não invaginam no pedículo). Enquanto que na esférula (terminal sináptico de bastonetes) há apenas uma invaginação central, onde ocorrem as sinapses com os axônios invaginantes das células horizontais e dendritos das células bipolares de bastonetes (tipo *ON*) e os dendritos de células bipolares *OFF* de cones formam contatos na base da esférula (não invaginam). Essas conexões são representadas na figura 9. Além dos contatos sinápticos mencionados, os pedículos de cones L e M conectam-se entre si e com esférulas de bastonetes por junções comunicantes localizadas na expansão lateral proporcionando uma interação entre esses fotorreceptores através de sinapse elétrica (ANDERSON; FISHER, 1976; KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000; WÄSSLE, 2004).

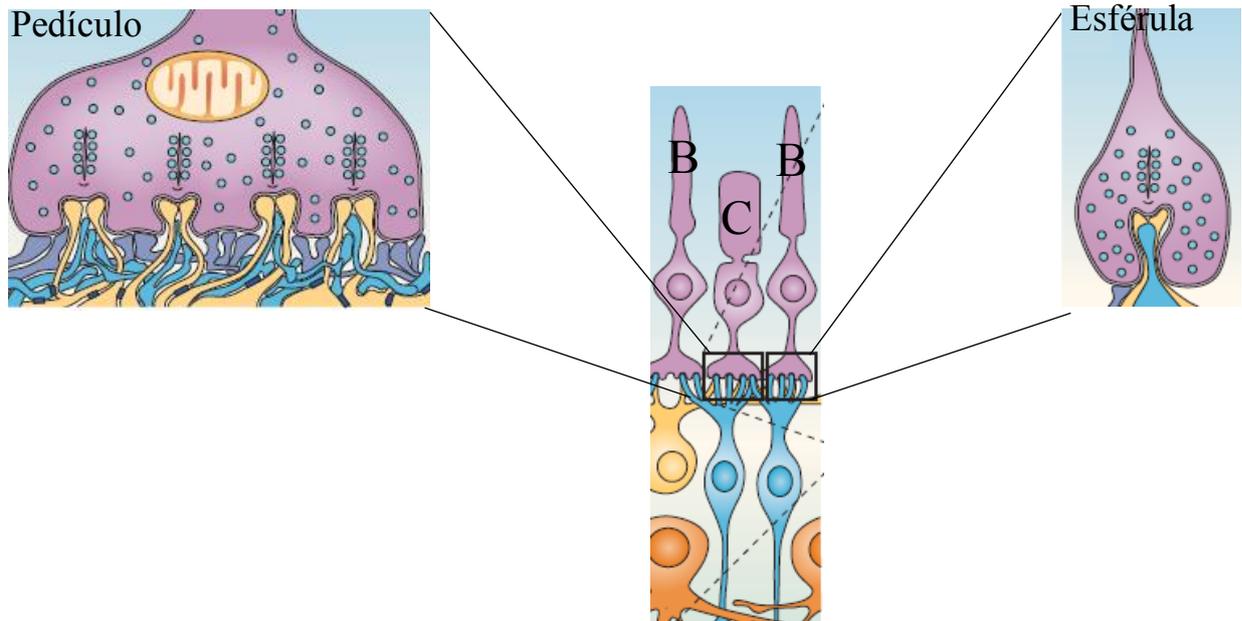


Figura 9. Conexões entre o terminal sináptico dos fotorreceptores e as células bipolares e horizontais. O pedículo, terminal sináptico de cones (C), possui quatro invaginações pré-sinápticas que conectam com os dendritos invaginantes das células horizontais (amarelo) e célula bipolar ON de cone (azul), arranjo sináptico denominado “tríade”. As células bipolares OFF fazem sinapses na base do pedículo (roxo). Enquanto que a esférula, terminal sináptico de bastonetes (B), possui apenas uma invaginação que se conecta com os dendritos invaginantes das células horizontais (amarelo) e das células bipolares ON de bastonetes (azul). Dendritos de célula bipolar OFF de cone fazem contato sináptico com a base da esférula (roxo) (Adaptado de WÄSSLE, 2004).

Os dendritos de uma única célula bipolar de bastonetes podem formar sinapses com 6 (na fóvea) a 40 esférulas (na periferia) transferindo um sinal escotópico ON. Vale ressaltar que as células bipolares de bastonetes não transmitem sinais diretamente às células ganglionares e sim através da sinapse com uma célula amácrina AII. Tais células amácrinas despolarizam na presença de luz e somam informações de muitas células bipolares ON de bastonete. Posteriormente, conectam-se com o terminal axonal de célula bipolar ON de cone por junção comunicante (sinapse elétrica) e através de sinapses químicas inibitórias com célula bipolar OFF de cone (RAVIOLA; DACHEUX, 1987; WÄSSLE, 2004).

Em seguida, essas células bipolares de cones fazem conexão sináptica com as células ganglionares. Essa via de bastonetes é a mais sensível pois é capaz de detectar a absorção de um único fóton. Outras rotas alternativas dos sinais provenientes de bastonetes incluem a sinapse elétrica entre a esférula do bastonete e o pedículo do cone além do contato direto entre células bipolares OFF de cone e esférulas (DEVRIES; BAYLOR, 1995; WÄSSLE, 2004).

Outra classificação de células bipolares de cones é baseada em sua morfologia: difusas, anãs ou *midget* e bipolar de cone S sendo cada tipo pertencente a uma via pós-receptoral distinta, de luminância ou cromaticidade. As células bipolares difusas transmitem informações de luminosidade para a camada plexiforme interna, enquanto que células bipolares *midget* e células bipolares do cone S transmitem sinal cromático proveniente de cones L e M ou sinais seletivos de cones S, respectivamente (DACEY, 1999; DACEY 2000; WÄSSLE, 2004).

As células bipolares de cones difusas são divididas em seis subclasses (DB1-DB6), classificadas de acordo com o nível de estratificação dos axônios na camada plexiforme interna. Essas fazem sinapses não seletivas (recebendo informações de cone L e M tanto para o centro quanto para periferia de seus campos receptivos) simultâneas com vários cones (entre 5 e 10 cones). Algumas células DB também se conectam com pedículos de cone S. As células bipolares de cones difusas transmitem sinais de luminosidade (DACEY 2000; WÄSSLE, 2004)

Já as bipolares de cones anãs ou *midget* se conectam diretamente com apenas um cone L ou M (“linhas exclusivas”) fornecendo um tipo específico de *input* de sinais de cones no centro do campo receptivo de uma célula ganglionar *midget* ou P. As células bipolares *midget* planas (FMB) carregam um sinal cromático OFF enquanto as células bipolares invaginantes carregam um sinal cromático ON (DACEY, 1999; WÄSSLE, 2004).

Outro tipo de célula bipolar se conecta seletivamente apenas a cones S, denominada célula bipolar azul ou bipolar de cone S que faz conexão sináptica com 1 a 5 cones apresentando respostas ON sinais seletivos de cones S (DACEY, 1999; CALKINS, 2001; WÄSSLE, 2004).

As células bipolares difusas e *midget* possuem campos receptivos com organização espacial centro-periferia antagônicos. Campo receptivo consiste na área da retina que, quando estimulada pela luz, gera uma alteração no potencial de membrana da célula. Segundo Squire et al. (2008) todos os neurônios visuais, do fotorreceptor ao córtex visual, apresentam um campo receptivo. Devido à presença desse campo, existe um fenômeno denominado antagonismo centro-periferia ou inibição lateral, que consiste no fato de uma parte do campo receptivo ser estimulada e a outra inibida ou ter sua resposta reduzida. Esse processo é mediado pelas células horizontais e amácrinas (BOYCOTT; WÄSSLE, 1991; BERNTSON; TAYLOR, 2000; DACEY, 2000; MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004).

A função de um campo receptivo é a detecção de contrastes entre um objeto e a região circundante. Esses contrastes podem ser devido às diferenças nos comprimentos de onda de um estímulo de luminância totalmente uniforme (isoluminante) ou na intensidade luminosa no espaço, no tempo ou ambos (contraste espacial, temporal, de movimento, respectivamente). Assim, esse antagonismo centro-periferia é a base do processamento de informação espacial do sistema visual e auxilia no refinamento da detecção da imagem gerando percepção de cor, movimento, direção e textura (BOYCOTT e WÄSSLE, 1991; SQUIRE et al., 2008).

O campo receptivo de uma célula bipolar é dividido em duas regiões antagônicas: o centro (que recebe aferências diretas dos fotorreceptores, via direta) e a periferia (que recebe aferências das células horizontais, inibição lateral, via indireta), fornecendo informação dos fotorreceptores, como mostra a figura 10. Esse antagonismo se deve as respostas do potencial de membrana de uma célula bipolar à luz no centro do seu campo receptivo serem opostas àquelas geradas pela luz na periferia do seu campo receptivo. Mais especificamente, as células bipolares *ON* possuem o centro do campo receptivo do tipo *on* (ativado pela luz) e a periferia do tipo *off* (desativado pela luz), enquanto as células bipolares *OFF* possuem centro *off* e periferia *on* (BOYCOTT; WÄSSLE, 1991; BERNTSON; TAYLOR, 2000; DACEY, 2000).

A presença da luz gera hiperpolarização dos fotorreceptores que constituem o centro do campo receptivo reduzindo a liberação de glutamato na fenda sináptica o que resulta na despolarização das células bipolares tipo *ON*. Enquanto isso as células horizontais ligadas aos fotorreceptores da periferia não iluminada do campo receptivo despolarizam, levando à hiperpolarização das células bipolares tipo *OFF* (Figura 10) (BOYCOTT; WÄSSLE, 1991; EULER; SCHNEIDER; WÄSSLE, 1996; DACEY, 2000; MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004).

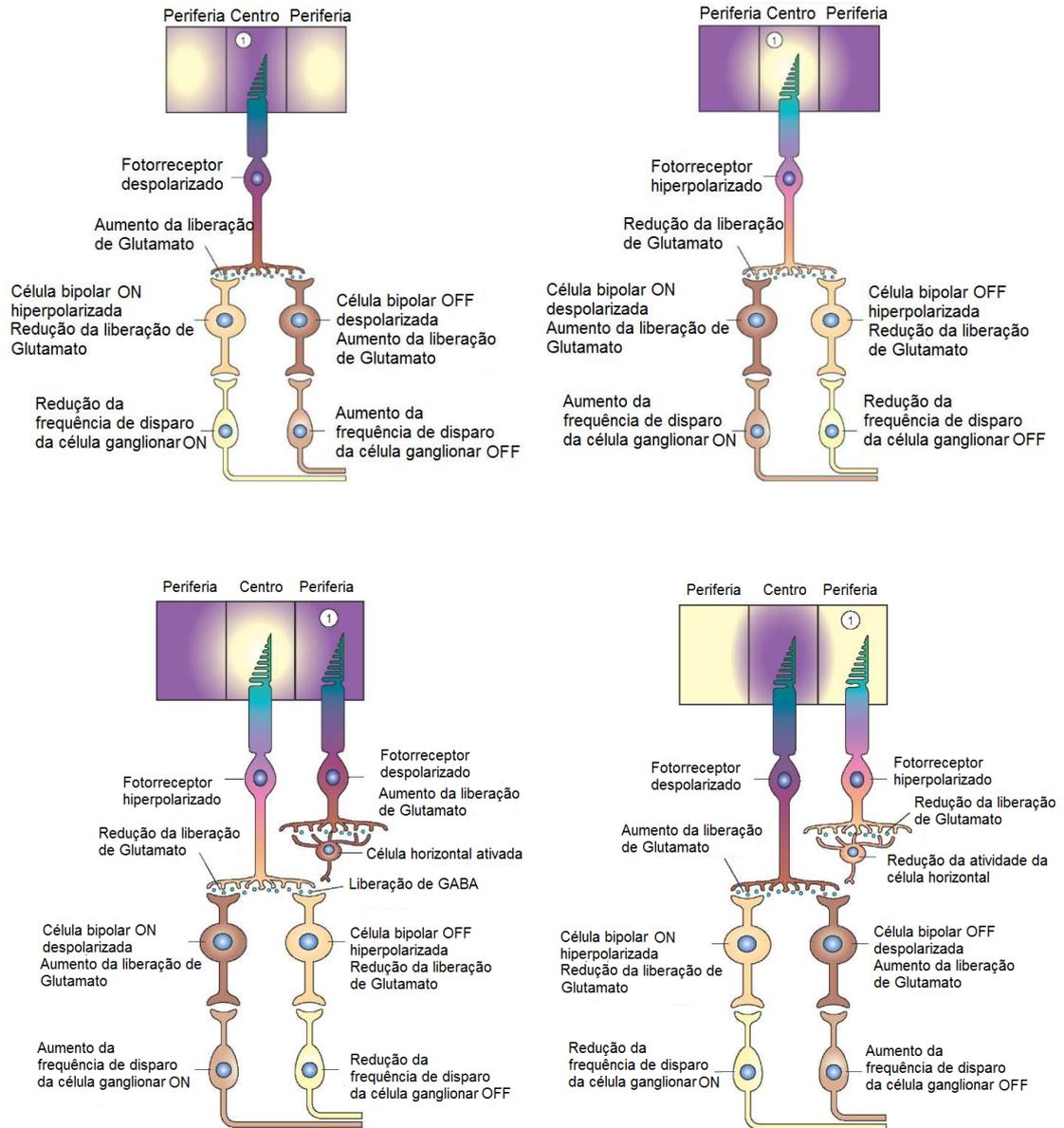


Figura 10. Representação esquemática da ativação das células bipolares *ON* e *OFF* (Adaptado de <http://what-when-how.com/neuroscience/visual-system-sensory-system-part-2/>. Acesso em 12/02/2013).

Dessa forma, na camada plexiforme externa, as células horizontais são interneurônios inibitórios que promovem inibição lateral por liberação de GABA (ácido α -aminobutírico), integrando e modulando, a transferência de informação nas conexões sinápticas entre fotorreceptores e células bipolares e fornecendo feedback aos fotorreceptores (DACEY, 2000; WÄSSLE, 2004). A retina da maioria dos primatas possui três tipos de células horizontais, denominadas H1, H2 e H3. As células horizontais expressam receptor ionotrópico de glutamato (AMPA e cainato), sendo hiperpolarizada pela luz. Quanto à especificidade, foi demonstrado que a célula horizontal H1 recebe informação de bastonetes e preferencialmente a cones L e M, enquanto que a célula H2 recebe sinais dos diversos tipos de cones e a H3 exclusivamente de cones L e M. O sinal modulado pelas células horizontais é, então, transmitido às bipolares (LEE et al., 1999, 2010; DOS REIS et al., 2002).

As células bipolares, por sua vez, liberam glutamato transmitindo os sinais para as células ganglionares, diretamente ou através de conexões com as células amácrinas.

No que se refere às células amácrinas, sabe-se que estas são interneurônios inibitórios cujas interações laterais modulam, de maneira inibitória, a transferência de informação nas sinapses excitatórias (glutamatérgica) entre células bipolares e células ganglionares, além de fazer contatos sinápticos com outras células amácrinas e fornecer feedback às células bipolares (DACEY, 1999, 2000; GERMAIN et al., 2010). As funções específicas das células amácrinas não são conhecidas. No entanto, já foram descritos cerca de 30 tipos morfológicos dessas células na retina de primatas (WÄSSLE, 2004; KOLB, 2003). Quanto à morfologia e neurotransmissor que possui, as células amácrinas podem ser gabaérgicas, as quais possuem processos axonais longos, sendo denominadas de células de campo grande (wide field), ou glicinérgicas, as quais possuem processos curtos, que geralmente se estendem por alguns estratos da camada plexiforme, e são denominadas células de campo estreito (narrow field). Os sinais provenientes das células bipolares são transferidos, então, às células ganglionares com ou sem intermédio das células amácrinas (WÄSSLE, 2004).

As células ganglionares também possuem organização centro-periferia ON-OFF (figura 11 B, D, F) como as bipolares as quais estão ligadas, assim, as células bipolares OFF transmitem seus sinais através de sinapses excitatórias para células ganglionares OFF, na camada plexiforme interna. Enquanto as células bipolares ON formam sinapses com células ganglionares ON (figura 10). Portanto, as células ganglionares OFF hiperpolarizam na presença de luz e são excitadas por estímulos mais escuros que o fundo e células ganglionares ON despolarizam na presença de luz e são excitadas por estímulos mais brilhantes do que o fundo. Existe ainda células ganglionares classificadas como ON-OFF que são sensíveis a variações de

iluminação podendo ser ativadas na presença ou na ausência de luz (DACEY, 1999, 2000; WÄSSLER, 2004).

A camada das células ganglionares da retina de mamíferos apresenta pelo menos 10 a 15 tipos morfológicamente diferentes de células ganglionares (MASLAND, 2001; WÄSSLE, 2004), cujas principais características que as distinguem são o tamanho e o padrão de ramificação de suas árvores dendríticas. Cada tipo de célula ganglionar é responsável pela codificação de diferentes aspectos das cenas visuais como contraste, tamanho, movimento, comprimento de onda, o que gera adequada resolução espacial e temporal com informação canalizada para 10-15 canais paralelos (WÄSSLER, 2004). Os principais tipos de células ganglionares presentes na retina de primatas são parasol (células M) e anãs ou *midget* (células P).

A células ganglionares parasóis (M) correspondem a 8 à 10% da população de células ganglionares (GERMAIN et al., 2010), apresentam resposta fásica ou transitória a estímulos de luminância (acromáticos), sendo altamente sensíveis a contrastes de luminância e com saturação em contrastes intermediários e altos e baixa sensibilidade a contraste de cor. As células M possuem corpo celular pequeno e árvore dendrítica densamente ramificada, contêm campos receptivos grandes e concêntricos, recebem sinais de cones L e de M no centro e periferia de seus campos receptivos que apresentam antagonismo espacial sem antagonismo cromático entre as regiões centrais e periféricas (figura 11 A e B). Logo, essas células participam da via pós-reptoral magnocelular de luminância (DACEY, 1999; NASSI; CALLAWAY, 2009; KREMERS 2010).

Por sua vez, as células ganglionares P totalizam cerca de 70 a 80 % de todas as células ganglionares, predominam no centro da retina, apresentam resposta tônica ou sustentada a estímulos de contraste de cor verde-vermelho e de médio e alto contraste de luminância, oponente cromática verde- vermelho, são células pequenas (3 vezes menor que a célula M) com árvores dendrítica densas e ramificação estreita. Seus campos receptivos são pequenos e concêntricos cujo centro e periferia recebem sinal de um único tipo de cone sendo centro L, periferia M ou centro M, periferia L (figura 11 C e D). As quatro classes de células P, por meio dos sinais oponentes de cones L e M que recebem, sinalizam a oponente de cor verde-vermelho ao cérebro, participando da via pós-reptoral parvocelular cromática (DACEY, 2000; NASSI; CALLAWAY, 2009; KREMERS, 2010).

Outro tipo de célula ganglionar encontrado em primatas são as células ganglionares K, ou biestratificadas, correspondem a cerca de 10 % das células ganglionares, apresentam extensão dendrítica semelhante à de célula M e parecem estar associadas à oponente azul-

amarelo recebendo sinais oponentes provenientes dos cones S e da adição dos cones L e M (DACEY 1999). Essas células apresentam resposta tipo ON sustentada a estímulos de cromaticidade azul e resposta tipo OFF a estímulos de cromaticidade amarela fazendo parte da via pós-reptoral cromática koniocelular (DACEY, 1999; NASSI; CALLAWAY, 2009; KREMERS, 2010). Assim, as respostas são S-ON/(L+M)-OFF como mostra a figura 11 E e F (LEE; MARTIN; GRUNERT, 2010).

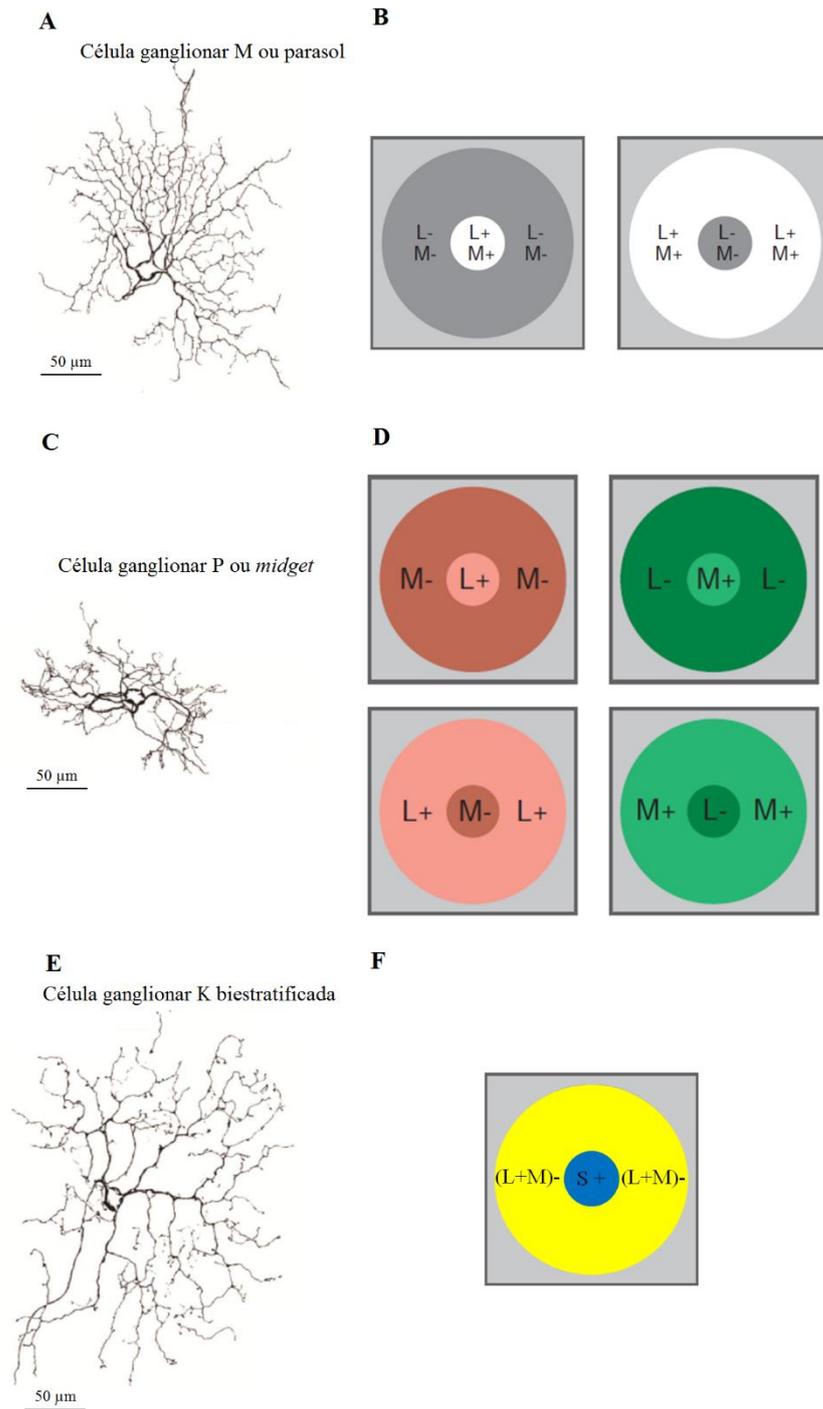


Figura 11. Morfologia e campo receptivo de células ganglionares M (parasol), P (*midget*) e K (biestratificada). Em A é apresentada a morfologia da célula M e em B seu campo receptivo. Em C e D são mostrados morfologia e campo receptivo de células ganglionares P, respectivamente. E apresenta a morfologia de células ganglionares K e F o campo receptivo dessas células (Adaptado de DACEY; LEE, 1994 e SQUIRE et al., 2008).

Distintos tipos celulares da retina combinam sinais de cones para gerar vias separadas de luminância (acromática, via magnocelular), cromática vermelho-verde (via parvocelular) e cromática azul-amarelo (via koniocelular) como mostra a figura 12. A via magnocelular soma sinais de cone L e M e possivelmente também de cone S através das células ganglionares M, codificando informações acromática ou de luminância. Já na via parvocelular as células ganglionares P recebem *input* excitatório dominante de um único cone L ou M, os sinais dos cones L e M são opostos e é a via responsável pela detecção de contraste cromático verde-vermelho, sendo também sensível à forma detalhes finos dos estímulos (DACEY, 2000). Enquanto que a discriminação azul-amarelo é originada na célula ganglionar K e interneurônios associados que combinam excitação de cone S com inibição de cones L e M (DACEY, 2000; WÄSSLE, 2004; NASSI; CALLAWAY, 2009).

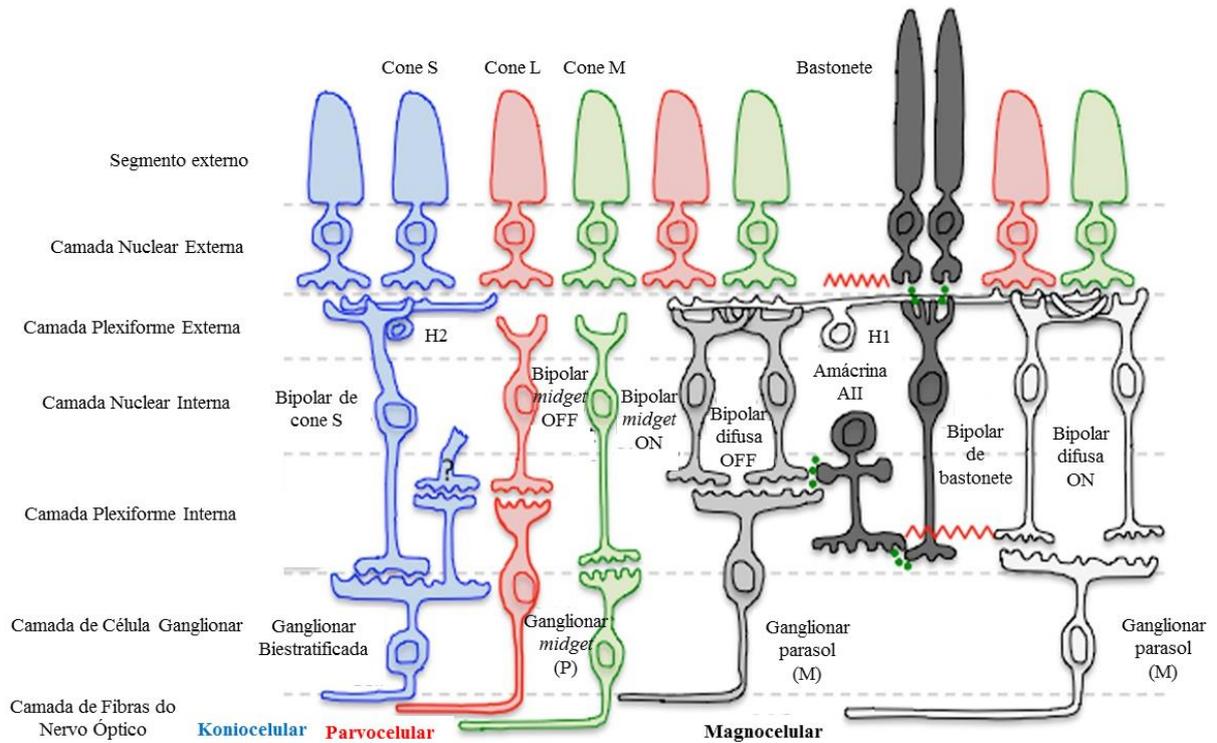


Figura 12. Vias visuais paralelas na retina. A via magnocelular transmite sinais de bastonete ou da soma de sinais de cone L e M através das células bipolares de bastonetes ou células bipolares de cone difusa, respectivamente, para células ganglionares parasol (M), codificando informações de luminância. Enquanto que na via parvocelular um único cone L ou M transmite informação para células bipolares de cone *midget*, que por sua vez transmitem o sinal para células ganglionares *midget* (P) permitindo a detecção de contraste cromático verde-vermelho. Já na via koniocelular, ocorre combinação de excitação de cone S com inibição de cones L e M cujo sinal é transmitido para células bipolares de cone S e, posteriormente, para células ganglionares biestratificada (K), propiciando a discriminação azul-amarelo (Adaptado de ZELE; CAO, 2014).

As células ganglionares provenientes das diversas vias pós-receptorais codificam o sinal recebido em uma frequência de disparo de potenciais de ação, conduzidos pelo nervo ótico, formados pelos axônios dessas células, para o núcleo geniculado lateral (NGL) do tálamo, que por sua vez, conecta-se com o córtex visual (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; KIPER, 2003; WÄSSLE, 2004).

O NGL de primatas tem formato semelhante a um cone assimétrico e possui 6 camadas sobrepostas (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e o córtex visual primário também é organizado em camadas (1, 2, 3, 4, 4A, 4B, 4C α , 4C β , 5 e 6). As células ganglionares M da retina projetam para as camadas magnocelulares (basais 1 e 2) do NGL que projetam para a camada 4C α de V1. Já as células ganglionares P projetam para as quatro camadas parvocelulares (dorsais 3, 4, 5 e 6) do NGL que, por sua vez, projetam para a camada 4C β de V1. Entre as 6 camadas do NGL encontra-se as camadas koniocelulares que parecem receber *input* das células ganglionares K e projetar para os *blobs* da camada 2/3 de V1 como mostra a figura 13 (CALLAWAY, 2005).

As informações visuais são transmitidas por meio das distintas vias retino-geniculado-cortical magnocelular, parvocelular e koniocelular que provavelmente permanecem segregadas pelo menos até o córtex visual primário (V1), região de aferência da terminação das vias, o qual transmite informações processadas para as outras áreas de maior hierarquia (V2, V3, V4) onde a seletividade e complexidade das respostas tende a aumentar em cada área subsequente (CALLAWAY, 2005; NASSI; CALLAWAY, 2009).

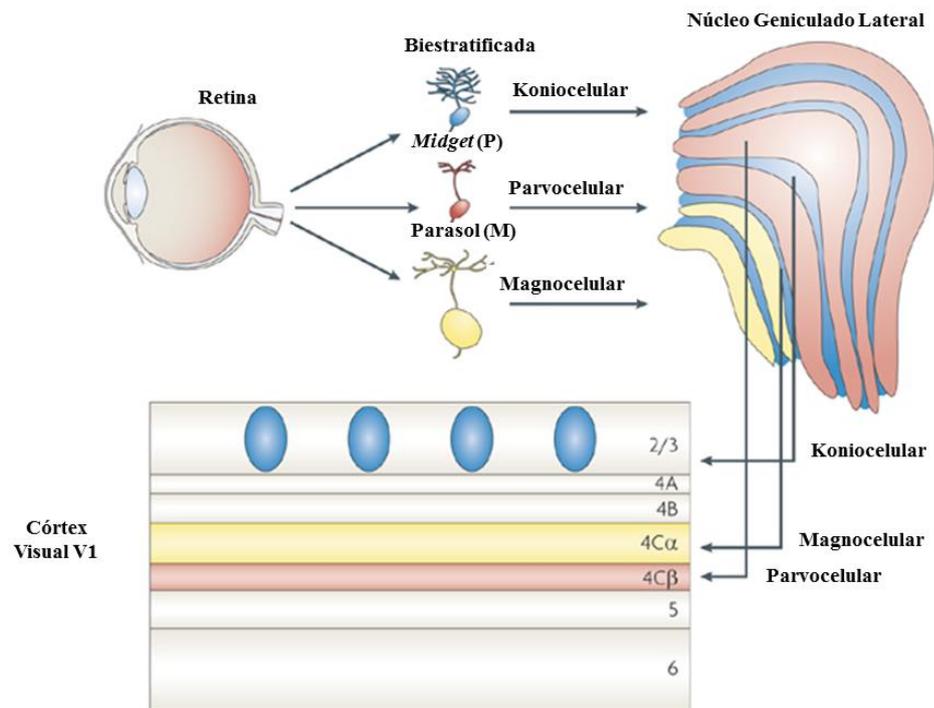


Figura 13. Vias paralelas da retina ao córtex. As células ganglionares e camadas do Núcleo Geniculado Lateral e Córtex Visual V1 que compõe as vias retino-geniculado-cortical magnocelular, parvocelular e koniocelular são representadas em amarelo, rosa e azul, respectivamente (Adaptado de NASSI; CALLAWAY, 2009).

1.3 ELETRORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL (ffERG)

Diferentes trabalhos têm sugerido que a função das vias pós-receptorais paralelas, assim como as repostas isoladas de cones L ou M podem ser avaliadas por eletrorretinograma (ESTÉVEZ; SPEKREIJSE, 1974; KREMERS, 2003; KREMERS; LINK, 2008; KREMERS et al., 2010; KREMERS; PANGENI, 2012).

O eletrorretinograma (ERG) é o registro da atividade elétrica das células da retina provocada por um estímulo visual. Essa resposta é desencadeada pela absorção de fótons pelo fotopigmento dos fotorreceptores, gerando uma alteração de voltagem na retina. O tipo de estímulo usado determina a modalidade de ERG podendo ser ERG de campo total (ffERG), ERG multifocal (mfERG) ou ERG de padrão reverso (PERG) (JACOB et al., 2011; WOLPERT; TSANG, 2011).

O eletrorretinograma de campo total (ffERG) consiste na avaliação em massa das células de toda a retina a partir da estimulação simultânea de todo o campo visual. Essa técnica é utilizada em todo o mundo para avaliar o funcionamento da retina, detectar, diagnosticar e monitorar doenças relacionadas com alterações funcionais na retina (MARMOR et al., 2009; JACOB et al., 2011; MCCULLOCH et al., 2015), sendo, também, utilizada em modelo animal (PAIK et al., 2012; BRASIL et al., 2016). Recentemente, tem se tornado cada vez mais importante para uma melhor compreensão dos processos fisiológicos dentro de diferentes subsistemas retino-geniculado-cortical (KREMERS; LINK, 2008; KREMERS et al., 2010; PARRY et al., 2012; JACOB et al., 2015; MARTINS et al., 2016).

O estímulo luminoso geralmente é dado por um equipamento chamado *Ganzfeld*, palavra do idioma alemão que significa “Campo Total”. Esse equipamento é formado por uma cúpula com interior constituído de uma superfície difusora branca de alta pureza. A estimulação é realizada através de modulação da fonte luminosa, podendo alterar características dos estímulos como intensidade, frequência temporal e cromaticidade e luminância (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006; JACOB et al., 2011).

Os potenciais elétricos gerados na retina pela luz podem ser captados por diferentes tipos de eletrodos ativos os quais podem ser posicionados em diferentes regiões: na córnea, como os eletrodos em forma de lente de contato dos tipos Burian - Allen ou ERG – Jet; na conjuntiva, como as fibras condutoras do tipo Dawson, Trick e Litzkow (DTL) ou eletrodos em forma de folhas de ouro; na superfície cutânea, como os eletrodos de superfície (MARMOR et al., 2009; HECKENLIVELY; ARDEN, 2006; MCCULLOCH et al., 2015).

O registro do ERG é obtido através da diferença de voltagem medida entre o eletrodo ativo e o eletrodo de referência. O eletrodo terra serve de zero, ou seja, a polaridade da voltagem registrada é positiva (eletrodo ativo) ou negativa (eletrodo referência) em relação ao eletrodo terra. Os eletrodos de referência e terra são geralmente eletrodos cutâneos e podem ser do tipo agulha (intradérmicos) ou de superfície (epidérmicos), feitos de metal como platina, prata, ouro, níquel, aço inoxidável (HECKENLIVELY; ARDEN, 2006). O eletrodo ativo detecta corrente extracelular gerada em resposta a um estímulo luminoso, demonstrada na figura 14.

Os protocolos utilizados para obtenção dos diferentes tipos de respostas no ffERG são baseados na condição de adaptação prévia ao escuro (escotópica) ou ao claro (fotópica) e condições de estimulação como intensidade e duração do estímulo e intervalo entre os estímulos (JACOB et al., 2011; MCCULLOCH et al., 2015). O ffERG registrado com a retina adaptada ao escuro em resposta a estímulos podem ser originados a partir de bastonetes quando o estímulo tem baixa intensidade luminosa e de bastonetes e cones quando os estímulos luminosos têm intensidade luminosa na faixa mesópica e fotópica e de cones quando o indivíduo é adaptado ao claro (MCCULLOCH et al., 2015).

Os tipos de resposta mais estudadas são: escotópica de bastonetes; escotópica mista (resposta mista de bastonete e cone); escotópica de potenciais oscilatórios (resposta que aparece na fase de subida da onda b e é obtida após filtragem passa-banda da resposta escotópica máxima); fotópica de cones ao flash único; fotópica de *flicker* (figura 15). Dentro do mesmo tipo de resposta pode-se variar a intensidade e duração do estímulo no intuito de realizar uma avaliação mais ampla da resposta elétrica da retina (MARMOR et al., 2009; MCCULLOCH et al., 2015).

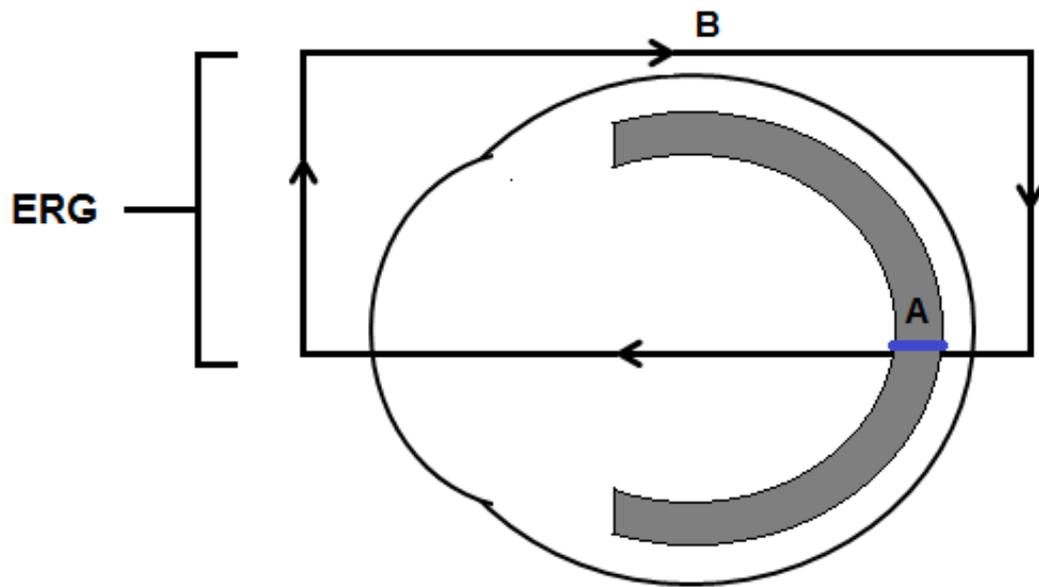


Figura 14. Correntes extracelulares geradas em resposta a estímulo luminoso no eletrorretinograma. A trajetória A da corrente representa a corrente local através da retina, enquanto a trajetória B mostra as correntes que saem da retina através do humor vítreo e da córnea e voltam à retina através da coróide e epitélio pigmentar. O registro do eletrorretinograma é obtido a partir da trajetória B (Adaptado de <http://webvision.med.utah.edu/book/electrophysiology/the-electroretinogram-erg/> Acesso em 18/01/2017).

As alterações de voltagem detectadas pelo ERG são denominadas de ondas ou componentes, os quais apresentam formas distintas dependendo das diferentes condições de adaptação e estimulação. Os componentes mais analisados nos estudos que utilizam o ffERG são a onda negativa (a) e a positiva (b), potencial oscilatório e componentes do *flicker*. Amplitude e tempo implícito ou fase desses componentes são medidos para avaliar a integridade funcional da retina como mostra a figura 15 (MARMOR et al., 2009; MCCULLOCH et al., 2015).

A amplitude da onda-*a* é a medida entre a linha de base e o pico máximo da onda-*a* e a amplitude da onda-*b* é a medida entre o pico máximo da onda-*a* e o pico máximo da onda-*b*. O tempo implícito de cada onda é medido entre o início do estímulo (*flash*) e o pico máximo da onda (MARMOR et al., 2009; MCCULLOCH et al., 2015).

A resposta ao *flicker*, que foi a utilizada no presente trabalho, é uma resposta conduzida preferencialmente pela via de cones que consiste na resposta a diferentes frequências temporais de estimulação. A amplitude da resposta ao *flicker* pode ser medida do vale ao pico da onda e o tempo implícito a partir do flash até o pico seguinte ao estímulo, usando a média de medições de várias ondas para determinar amplitude e tempo implícito. Uma análise mais detalhada da resposta ao *flicker* tem sido realizada no domínio da frequência decompondo a resposta em três componentes denominados primeiro harmônico (ou fundamental, F); segundo harmônico (2F), terceiro harmônico (3F). Tal análise foi utilizada no presente estudo por ser útil para detectar sinais alterados e fornecer informações fisiologicamente importantes sobre fase e amplitude dos componentes harmônicos da resposta (MCCULLOCH et al., 2015).

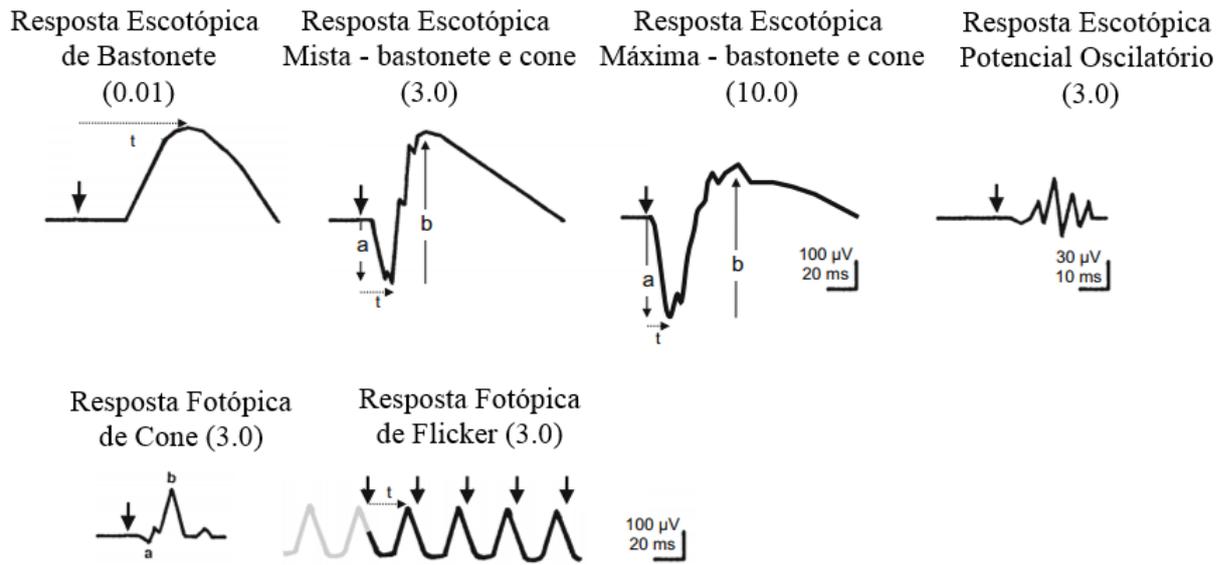


Figura 15. Formas de ondas obtidas pelo eletroretinograma de campo total. As formas de ondas são obtidas a partir de diferentes protocolos padronizados pela ISCEV (Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Visual Clínica). As cabeças de seta em negrito indicam o flash; as setas sólidas indicam as amplitudes de onda a e onda b; as setas pontilhadas indicam como medir o tempo implícito (Adaptado de MCCULLOCH et al., 2015).

A associação entre as respostas no ERG e suas origens celulares, desde a ativação dos fotorreceptores até as vias pós-receptorais, proporciona uma melhor compreensão sobre a função normal do complexo sistema visual. Cada componente da onda é gerado por determinado grupo celular. A onda-a negativa é gerada principalmente pela hiperpolarização de fotorreceptores e células bipolares OFF, enquanto a onda-b positiva é gerada pela despolarização das células bipolares do tipo *ON* e das células de *Müller* (células da glia que se estendem por toda a largura da retina, desempenham uma função de suporte aos diferentes elementos celulares e manutenção da integridade estrutural da retina). A onda c positiva mais lenta é gerada pela hiperpolarização do epitélio pigmentar. Enquanto o potencial oscilatório reflete correntes elétricas extracelulares geradas pelas células amácrinas (NOELL, 1954; JACOB et al., 2011).

Quanto ao *flicker*, a frequência de estimulação mais utilizada da clínica oftalmológica é a de 30 Hz, ou seja, 30 estímulos por segundo, cuja resposta é originada pelo sistema de cone com vias pós-receptorais ON e OFF. Em geral quanto maior a frequência temporal de estimulação, maior a contribuição das células bipolares e menor a contribuição dos cones para a geração das ondas (MCCULLOCH et al., 2015).

1.3.1. Estimulação seletiva de cones L e M e das vias pós-receptorais magnocelular e parvocelular

Muitos estudos suportam a teoria de que as respostas ao *flicker* no ERG que contêm informação cromática vermelho-verde e de luminância em altas frequências temporais (> 30 Hz) refletem a atividade da via pós-reptoral de luminância magnocelular, enquanto em frequências intermediárias (8-12 Hz) refletem a ativação do canal cromático vermelho-verde baseado na via pós-reptoral parvocelular. Como os estímulos de isolamento de cone L e M as respostas desse isolamento podem fornecer informações sobre o *input* do cone para as duas vias pós-receptorais quando utilizadas frequências temporais de estimulação altas e intermediárias (KREMERS; LINK, 2008; CHALLA et al., 2010; KREMERS et al., 2010; KREMERS; PANGENI, 2012; KOMMANAPALLI et al., 2014; JACOB et al., 2015; MARTINS et al., 2016).

A razão entre as respostas de cone L e M ao *flicker* corrobora essa informação, sendo geralmente maior que 1 em altas frequências temporais de estimulação concordando com achados psicofísicos relacionados ao canal de luminância, mediado pela atividade magnocelular, enquanto que a razão L/M é próximo a 1 em *flicker* com frequência temporal

intermediária de 12 Hz, propriedade do canal cromático verde-vermelho mediado pela atividade parvocelular. Outra característica que indica atividade da via parvocelular é a diferença entre as fases das respostas de cone L e M (L-M) ser próxima a 180° , que ocorre em 12 Hz (KREMERS et al., 2000; KREMERS; LINK, 2008; CHALLA et al., 2010; JACOB et al., 2015).

Esse isolamento da resposta de fotorreceptor tem sido realizado por diversas técnicas e dentre elas a técnica considerada mais vantajosa é a Tripla Substituição Silenciosa, pois permite completo isolamento da resposta de uma classe de fotorreceptor, por estimulação seletiva de um tipo de fotorreceptor (mudança no estado de excitação) a partir do uso de estímulos de luzes monocromáticas com diferentes comprimentos de onda que quando alternados não causam mudança no estado de excitação dos demais fotorreceptores (o número de fotoisomerização, absorção de um fóton pelo fotopigmento, permanece constante), sendo assim, “silenciados” como exemplificado na figura 16. Dessa forma, três tipos de fotorreceptores, incluindo bastonetes, são “silenciados” e apenas um fotorreceptor, tipo L ou M está apto a responder (ESTÉVEZ; SPEKREIJSE, 1974, 1982; KREMERS, 2003; KREMERS; PANGENI, 2012).

Para isolamento efetivo de um único tipo de fotorreceptor, o número de primárias (fonte de luz colorida ou LEDs) necessárias para estimulação deve ser ao menos igual ao número de tipos de fotorreceptores presentes, no caso de humanos tricromatas, quatro (bastonete, cone S, cone L e cone M) tal como usado no presente estudo (SHAPIRO; POKORNY; SMITH, 1996).

A Tripla Substituição Silenciosa é extremamente útil para o estudo dos sinais das vias originadas nos diferentes tipos de fotorreceptores isoladamente o que permite o diagnóstico e monitoramento da progressão e tratamento de alterações retinianas que comprometem o funcionamento da via mediada por um fotorreceptor específico (KREMERS, 2003). A eficácia do método já foi comprovada em indivíduos dicromatas, que não possuem cones L ou M (KREMERS; PANGENI, 2012; KREMERS et al., 2014; MCKEEFRY et al., 2014).

A referida técnica baseia-se no princípio da univariância em que a excitação dos fotorreceptores (hiperpolarização) causada por uma fotoisomerização é invariante e não é dependente do conteúdo energético e do comprimento de onda do fóton absorvido. No entanto, a probabilidade de um fóton ser absorvido depende do seu comprimento de onda e é descrito por espectro de absorção ou, no nível da córnea, pela sensibilidade espectral ou fundamentos. Logo, utilizando estímulos com comprimento de onda que possuam mesma probabilidade de terem seus fótons absorvidos por um determinado fotorreceptor a alternância deles gera aproximadamente a mesma magnitude de hiperpolarização, não mudando o estado de excitação do fotorreceptor, sendo assim “silenciado” como mostra a figura 16 (ESTÉVEZ; SPEKREIJSE, 1974, 1982; KREMERS, 2003).

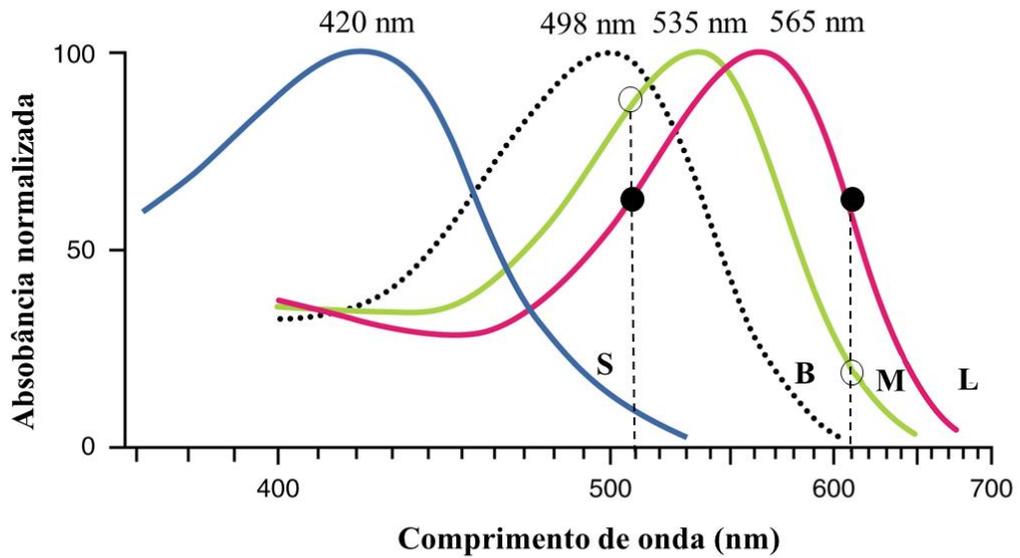


Figura 16. Exemplo do tipo de estimulação utilizada no método de substituição silenciosa. A ilustração mostra o uso de dois estímulos com diferentes comprimentos de onda (linha tracejada) que quando alternados causam excitação do cone M e não alteram o estado de excitação do cone L, isolando a resposta de cone M e “silenciando” o cone L. Os círculos preenchidos correspondem a absorção de fótons pelo cone L (o número de fotoisomerização) induzido por estímulo de diferentes comprimentos de onda. O número de fotoisomerização permanece constante com a alternância dos dois estímulos, sem alteração no estado de excitação do cone L pois esses estímulos possuem comprimentos de onda com mesma probabilidade de terem seus fótons absorvidos pelo cone L gerando aproximadamente mesma magnitude de excitação. Os círculos não preenchidos correspondem a absorção de fótons pelo cone M com os mesmos estímulos gerando mudança no estado de excitação desse cone quando alternados (Adaptado de ESTÉVEZ; SPEKREIJSE, 1974).

Com o uso de técnicas específicas de estimulação visual no ERG pode-se avaliar a atividade diferencial de cones e vias retinianas sendo uma valiosa ferramenta para auxiliar na melhor compreensão de fenômenos fisiológicos como o fenômeno de adaptação à luz (ARMINGTON; BIERSDORF, 1958; GOURAS; MACKAY, 1989; PEACHEY et al., 1989, MURAYAMA; SIEVING, 1992; BENOIT; LACHAPELLE, 1995; ALEXANDER et al., 2006; JACOB et al., 2011; VINCENT; ROBSON; HOLDER, 2013; MCANANY; NOLAN, 2014).

1.4 FENÔMENO DE ADAPTAÇÃO À LUZ

O fenômeno de adaptação à luz consiste em mudanças na sensibilidade do sistema visual à luz frente a exposição prolongada à iluminação após um período no escuro. A variação da iluminação do ambiente do escuro, no qual o sistema visual está adaptado ao escuro, com maior sensibilidade à luz, (Figura 17 A) para luminosidade intensa ativa diferentes mecanismos gerando, inicialmente, um estado de ofuscamento instantâneo (Figura 17 B) e posteriormente mudanças na sensibilidade à luz para, assim, alcançar um estado de adaptação visual ao claro retomando a acuidade adequada da cena visual como demonstra a figura 17 C (ARMINGTON; BIERSDORF, 1958; GOURAS; MACKAY, 1989; PEACHEY et al., 1989, MURAYAMA; SIEVING, 1992; BENOIT; LACHAPELLE, 1995; ALEXANDER et al., 2006).



Figura 17. Cena visual representativa do processo de adaptação à luz. Em A é apresentada a imagem no ambiente escuro, quando o sistema visual se encontra adaptado ao escuro, com alta sensibilidade à luz. Em B está demonstrado o ofuscamento causado pelo brusco aumento no nível de iluminação ou acender das luzes do ambiente após um período no escuro e a imagem C demonstra a adaptação ao claro que ocorre após alguns minutos de exposição à luz retomando a acuidade visual após mudanças na sensibilidade à luz.

Quando a iluminação do ambiente muda, como do escuro para iluminação mais intensa, mecanismos de adaptação nos fotorreceptores e vias pós receptorais podem agir de forma diferente (ou seja, variar em suas mudanças de sensibilidade e período em que ocorre o processo de adaptação à luz) para manter o sistema visual dentro de uma faixa de funcionamento ideal. Esse fenômeno tem sido avaliado por eletrorretinograma de campo total, que permite observar uma propriedade de aumento de amplitude de diversos componentes de resposta em função do tempo de adaptação ao claro. Este achado é encontrado na seguinte condição: (i) um sujeito a ser testado é adaptado ao escuro por um tempo superior a 20 minutos; (ii) após o período de adaptação ao escuro, o sujeito testado é colocado em uma cúpula com intensidade luminosa em níveis fotópicos; (iii) de tempo em tempos há a estimulação com um flash de luz com intensidade luminosa acima do nível de iluminação do fundo da cúpula (ARMINGTON; BIERSDORF, 1958; MIYAKE et al., 1987; PEACHEY et al., 1989; PEACHEY; ALEXANDER; FISHMAN, 1991; PEACHEY et al., 1992; MILLER; SANDBERG, 1991; MCANANY; NOLAN, 2014).

Diversos estudos demonstraram que na resposta de cone no ERG de campo total a um único *flash* de alta intensidade, as ondas a, b, i e potencial oscilatório, aumentam gradualmente em amplitude durante a adaptação à luz após um prévio período de adaptação ao escuro. Alguns estudos encontraram uma diminuição concomitante no tempo implícito dos componentes acompanhando o aumento na amplitude. Estas mudanças nas amplitudes e nos tempos implícitos são lentas, e os tempos de adaptação são da ordem de vários minutos (ARMINGTON; BIERSDORF, 1958; GOURAS; MACKAY, 1989; PEACHEY et al., 1989; MURAYAMA; SIEVING, 1992; BENOIT; LACHAPELLE, 1995; ALEXANDER et al., 2006).

O *flicker* gerado por *flashes* de alta frequência temporal ou modulação de onda senoidal mostram uma adaptação à luz semelhante à gerada com estímulo de *flash* único. As amplitudes da resposta ao *flicker* aumentaram e as fases diminuíram fortemente nos primeiros 5 minutos de exposição ao campo de adaptação e saturaram-se depois de cerca de 10 minutos como mostra a figura 18 (PEACHEY; ALEXANDER; FISHMAN, 1991; PEACHEY et al., 1992). Por essa razão, a Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Visual Clínica (ISCEV) recomenda a adaptação do olho a um fundo claro por pelo menos 10 minutos após ter sido totalmente adaptado ao escuro antes de fazer o registro fotópico do ERG (MCCULLOCH et al., 2015).

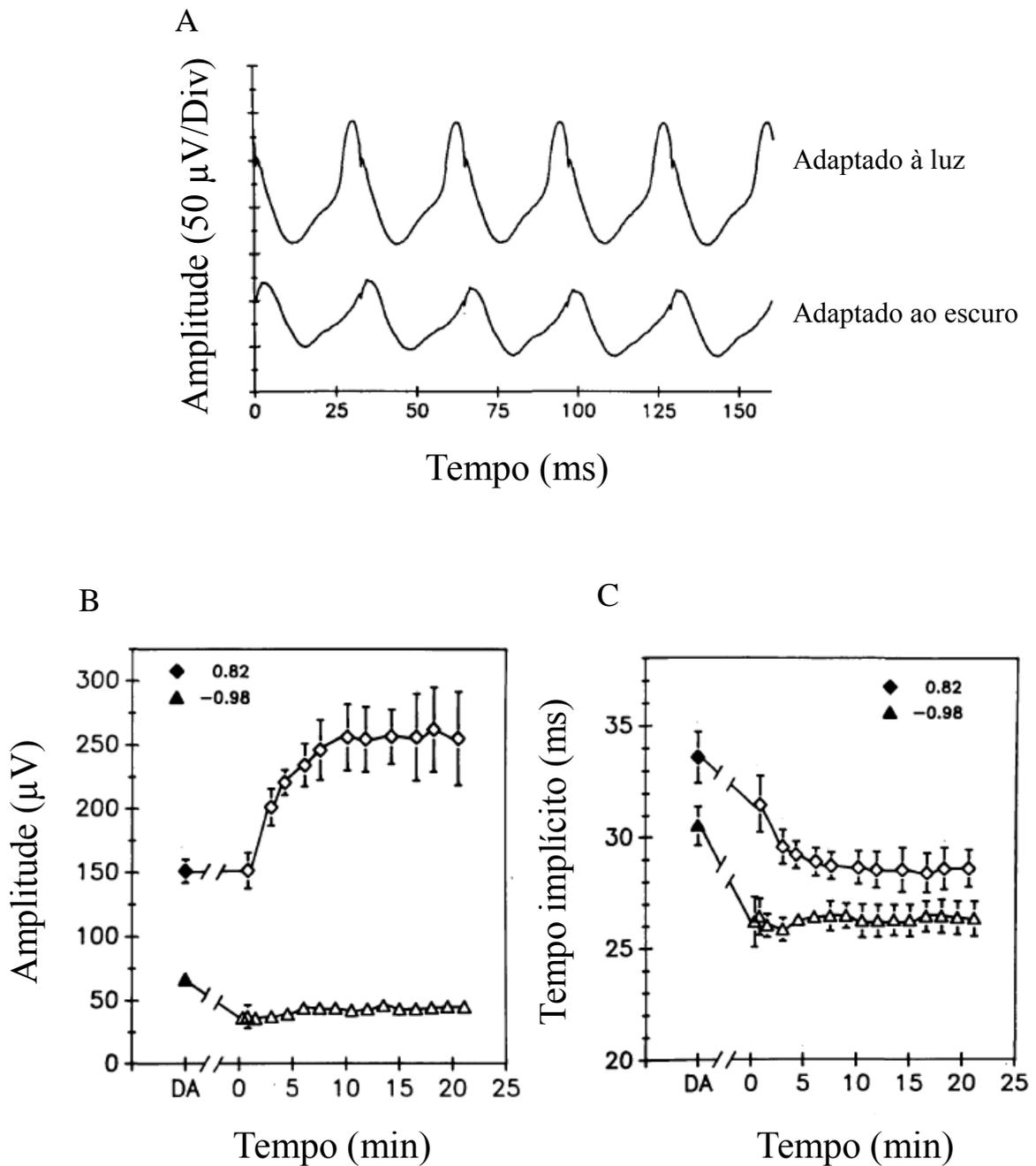


Figura 18. Adaptação à luz no eletrorretinograma de campo total por PEACHEY; ALEXANDER; FISHMAN, 1991. Em A, ERGs obtidos com estímulos tipo flicker de $0,82 \log \text{cd.s}/\text{m}^2$ apresentado a sujeitos saudáveis em condições de adaptação ao escuro (linha abaixo) e após 21 min de adaptação à luz a um campo de adaptação de $1,34 \log \text{cd}/\text{m}^2$ (linha acima). Em B e C, amplitudes e tempo implícito, respectivamente, obtidas no escuro (símbolos preenchidos) ou em função do tempo de adaptação à luz de $1,34 \log \text{cd}/\text{m}^2$ (símbolos abertos), usando flicker com luminância de $-0,98$ (triângulos) ou $0,82$ (diamantes) $\log \text{cd sec} / \text{m}^2$. Cada ponto representa a média de 3 sujeitos com desvio padrão. Observa-se um aumento na amplitude de resposta em função do tempo de adaptação à luz com estímulos de maior luminância ($0,82 \log \text{cd.s}/\text{m}^2$) concomitante com uma redução no tempo implícito. Nos primeiros 5 minutos de exposição ao campo de adaptação essas variações são grandes e saturaram depois de cerca de 10 minutos (Adaptado de PEACHEY; ALEXANDER; FISHMAN, 1991).

Compreender e estabelecer as mudanças que subjazem ao fenômeno de adaptação à luz em sistemas visuais normais também tem relevância clínica. Por exemplo, pacientes com cegueira noturna congênita estacionária incompleta e com retinite pigmentosa mostram diferentes magnitudes e cinéticas de mudança de amplitude durante a adaptação fotópica com estímulos de *flicker* de 30 Hz em comparação com indivíduos saudáveis (MIYAKE et al., 1987, MILLER; SANDBERG, 1991). Assim, a cinética e magnitude de adaptação à luz pode auxiliar a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no fenômeno e pode ser utilizada como um biomarcador funcional para diversas doenças retinianas.

Não há um consenso sobre o substrato fisiológico que explique o aumento da amplitude do eletrorretinograma de campo total em função do tempo de adaptação ao claro. Várias hipóteses sobre os mecanismos subjacentes à esse fenômeno foram propostas (ARMINGTON; BIERSDORF, 1958; NORMANN; PERLMAN, 1979; GOURAS; MACKAY, 1989; KONDO, 1999; CAMERON; LUCAS, 2009), sendo duas das quais ainda aceitas. Propõe-se que o fenômeno seja causado por uma redespolarização lenta dos fotorreceptores cone durante a adaptação à luz após hiperpolarização inicial (DOWLING; RIPPS, 1971; GOURAS; MACKAY, 1989). Tal hipótese tem sido confirmada com estudos da variação do potencial de membrana dos cones em função do tempo de adaptação ao claro, pois o tempo de adaptação do ERG e as mudanças de potencial de membrana dos cones após ligar uma luz de adaptação se assemelham (NORMANN; PERLMAN, 1979; MATTHEWS et al., 1988).

A segunda hipótese envolve a diminuição gradual de um efeito supressor da fototransdução de bastonetes em respostas de cone do ERG com o tempo de adaptação ao claro, ou seja, os bastonetes exercem uma inibição sobre os cones e com a adaptação ao claro e consequente desligamento dos bastonetes, os cones perderiam a inibição e poderiam responder com amplitude cada vez maior (ARDEN; FRUMKES, 1986). Essa hipótese foi reforçada por Kondo et al. (1999) ao revelarem, através de eletrorretinograma multifocal (mfERG), maiores aumentos de amplitude durante a adaptação à luz na periferia retiniana, dominada por bastonetes (figura 19). O suporte adicional à essa hipótese vem do trabalho com camundongos *Gnat1* - / -. Esses camundongos são desprovidos da subunidade α da transducina de bastonete, portanto, não têm bastonetes funcionais. O crescimento da amplitude e a diminuição do tempo implícito da onda b fotópica durante a adaptação à luz foram menores nestes camundongos comparados aos animais do tipo selvagem (CAMERON; LUCAS, 2009).

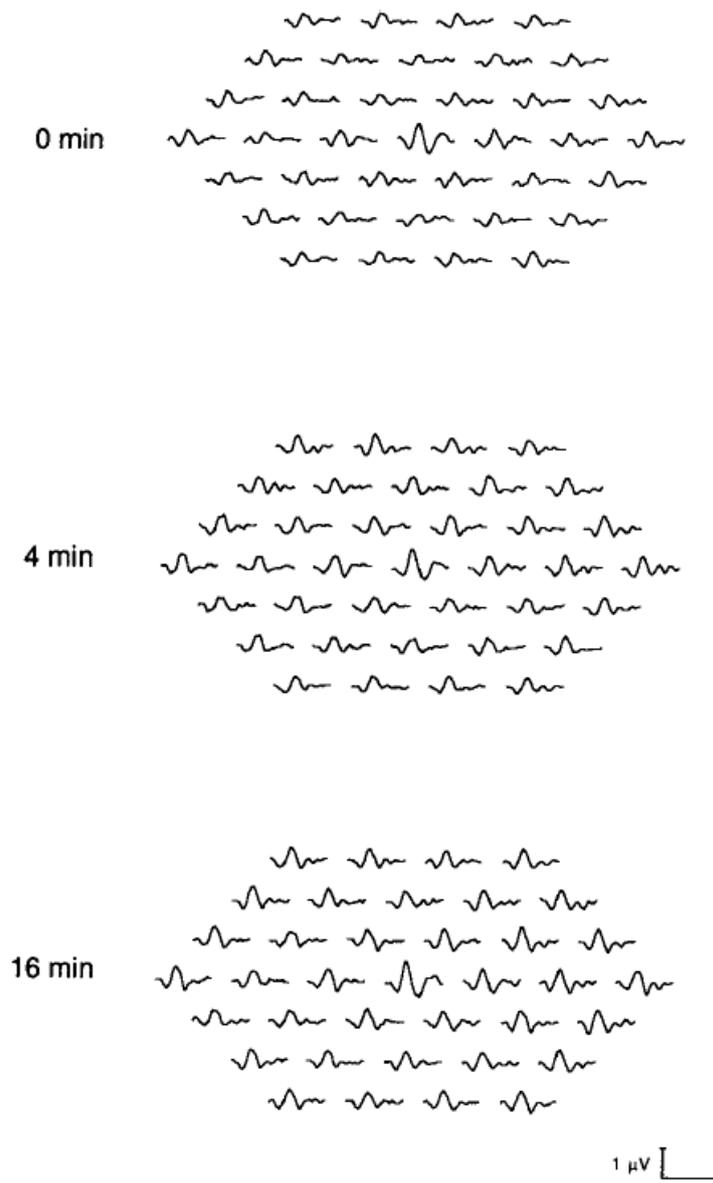


Figura 19. Aumento de amplitude do eletroretinograma multifocal durante a adaptação à luz por KONDO et al., 1999. ERGs multifocais registrados em diferentes momentos após o início de adaptação de luz obtida a partir de sujeitos saudáveis. Nota-se que o aumento de amplitude foi mais proeminente na retina periférica do que na retina central (KONDO, et al, 1999).

Recentemente, McAnany e Nolan (2014) descreveram mais detalhadamente a natureza e a extensão das mudanças de resposta de *flicker* do ERG durante a adaptação à luz medindo as respostas à estímulos de modulação senoidal do campo de adaptação e extraíndo os componentes primeiro harmônico (F), segundo harmônico (2F) e terceiro harmônico (3F) das respostas à 31 Hz usando a transformada rápida de Fourier (FFT). Estes parâmetros foram, então, modelados com o inverso de uma função exponencial para obter uma estimativa das constantes de tempo (também chamada de constante de semi-saturação, que corresponde à metade do tempo em que a curva de amplitude ou fase em função do tempo de adaptação fotópica satura) e magnitudes de variação nas amplitudes e fases do ERG para avaliar a sua cinética. Esses autores mostraram que de 0 a 15 minutos de adaptação à luz, os diferentes componentes harmônicos mudam de forma distinta em magnitude e curso temporal.

A amplitude de F aumentou quase duas vezes (fator~ 2) com constante de tempo de 3 minutos, 2F aumentou com um fator de 1,4 com constante de tempo de 0,4 minutos, sendo o componente com adaptação mais rápida. 3F aumentou mais que os demais componentes com um fator de 4,6 com curso temporal de 1,4 minutos. A fase do F não mudou com o tempo de exposição à luz de fundo, enquanto que as fases dos componentes 2F e 3F aumentaram aproximadamente 45 ° com uma constante de tempo de cerca de 2 min (figura 20).

Esta descoberta questiona se um mecanismo geral é a base de todas as mudanças da resposta ao ERG ou se elas diferem entre sinais originados em diferentes tipos de fotorreceptores cones ou vias pós-receptorais. Se as mudanças dependessem apenas de um mecanismo poderia se esperar que sua dinâmica fosse a mesma para todos os circuitos de retina. Por outro lado, se as diferentes vias têm mecanismos de adaptação distintos, então a dinâmica das mudanças pode depender do circuito estimulado. Este fato também significaria que as teorias propostas até agora só podem ser parcialmente corretas.

De uma forma geral, os estudos utilizam estímulos que provocam atividade de todos os fotorreceptores cones conjuntamente não tendo sido realizado experimentos com estímulos para isolamento de cones e das vias pós-receptorais estudando a variação de amplitude e fase do ERG de campo total em função da adaptação à luz. Nesse contexto, o presente estudo visa determinar como as respostas ao *flicker* no ERG com estímulos de ondas senoidais mediadas por diferentes sistemas de cone mudam durante a adaptação à luz. Especificamente, as características e a dinâmica dos sinais originados nos subsistemas conduzidos por cones L e M e pelas vias pós-receptorais magno e parvocelular foram analisados separadamente.

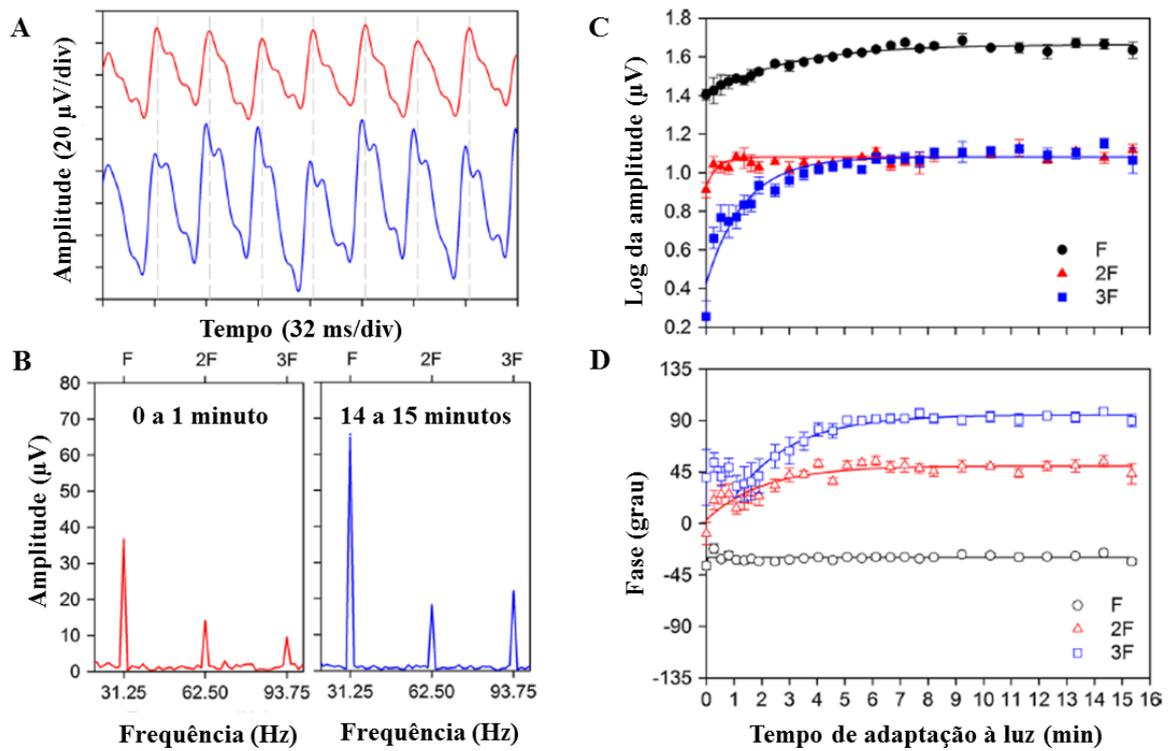


Figura 20. Mudanças nos componentes harmônicos do *flicker* no eletrorretinograma durante a adaptação à luz. Em A, os registros médios das formas de onda ao longo de um intervalo de 1 minuto (superior) e 15 minutos (inferior) de adaptação à luz. Em B, os espectros derivados de FFT para as formas de onda do ERG registadas no início (esquerda) e final (direita) da adaptação à luz. Em C, a amplitude média em log (± 1 EPM) de 5 sujeitos para F (círculos), 2F (triângulos), 3F (quadrados) em função da duração da adaptação à luz. Em D, a média da fase (± 1 EPM) de 5 sujeitos para F (círculos), 2F (triângulos), 3F (quadrados) em função da duração da adaptação à luz (Adaptado de MCANANY; NOLAN, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do estudo é avaliar a magnitude e padrão temporal da variação das respostas elétricas da retina para estímulos seletivos à cone L e à cone M e para estímulos específicos da via de luminância e da via de cor vermelho-verde, possibilitando a avaliação da atividade das vias visuais parvocelular e magnocelular, durante a adaptação à luz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a magnitude de variação de amplitude e fase das respostas eletrorretinográficas isoladas de cone L e M e da via de luminância e de cor vermelho-verde à estímulos com frequências temporais intermediária e alta ao longo do tempo de adaptação à luz.
- Estimar e comparar a constante de tempo das variações de amplitude e fase do ERG em função do tempo de adaptação à luz para condições de isolamento de cones L e M e das vias de luminância e de cor vermelho-verde à estímulos com frequências temporais intermediária e alta.
- Avaliar a relação entre as respostas obtidas com isolamento de cone L e M em altas e intermediárias frequências temporais e atividade das vias magnocelular e parvocelular.
- Comparar a cinética e a magnitude de variação das respostas que refletem a atividade da via parvocelular com as que refletem atividade da via magnocelular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no período de doutorado sanduíche (março de 2015 a fevereiro de 2016) pelo Programa Ciências Sem Fronteiras do Ministério da Educação do Brasil no departamento de oftalmologia da Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg em Erlangen, Alemanha, sob supervisão do professor doutor Jan Kremers.

3.1 SUJEITOS

Seis sujeitos saudáveis (2 homens e 4 mulheres entre 26 e 35 anos de idade), tricromatas sem queixas visuais ou história de doença ocular participaram dos experimentos.

Todos os sujeitos foram submetidos à avaliação oftalmológica através de exames de biomicroscopia, fundoscopia avaliação da refração e acuidade visual para excluir sujeitos com distúrbios retinianos ou com déficits na visão de cor (usando o teste de visão de cor anomaloscópio HMC, *Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Germany*), garantindo a participação apenas de indivíduos tricromatas.

O estudo contou com amostra por conveniência e os sujeitos foram incluídos na pesquisa quando se enquadraram nos critérios de inclusão e excluídos quando apresentaram ao menos um dos critérios de exclusão mencionados abaixo:

Critérios de inclusão:

- Não apresentar queixas visuais;
- Não apresentar alterações oculares;
- Ser tricromata e não apresentar alterações na visão de cores;
- Não apresentar doenças sistêmicas, genéticas ou neurológicas que possam afetar o sistema visual;
- Aceitar participar da pesquisa.

Critérios de exclusão:

- Apresentar qualquer alteração na visão de cores;
- Ser portador de doenças sistêmicas, genéticas ou neurológicas que possam afetar o sistema visual;

- Ser portador de doenças oculares (catarata, ceratite, conjuntivite, degeneração macular relacionada a idade, estrabismo, glaucoma, olho seco, uveíte etc);
- Ser portador de epilepsia;
- Ter sido submetido à cirurgia para correção de erros refrativos;
- Apresentar pressão intraocular elevada;
- Usar medicamentos conhecidos por afetar os resultados do eletrorretinograma;
- Alcoólatras, tabagistas e/ou usuários de drogas ilícitas;
- Recusa a participar da pesquisa.

Uma vez selecionados os participantes, após exames oftalmológicos e teste de visão de cor, os indivíduos estavam aptos à realização do eletrorretinograma de campo total.

A participação dos sujeitos foi voluntária, garantindo a todos o abandono do estudo a qualquer momento e o sigilo da identidade. Os indivíduos foram informados acerca dos objetivos do presente estudo, de todos os procedimentos a serem realizados, concordando em participar do trabalho. Os experimentos respeitaram os princípios da declaração de Helsinki e o protocolo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Erlangen-Nürnberg, sob protocolo de aprovação 329_12B.

3.2 ESTÍMULOS VISUAIS

Os sujeitos saudáveis foram, então, submetidos ao eletrorretinograma de campo total. Os registros foram realizados usando o Sistema de registro eletrofisiológico RETIport (Roland Consult, Wiesbaden, Alemanha). Os estímulos consistiram em ondas senoidais (por modulação senoidal do campo de adaptação com frequências temporais de 12 e 36 Hz) apresentados por uma cúpula de *Ganzfeld* (Q450 SC; Roland Consult) com seis conjuntos de LEDs (diodos emissores de luz) de luzes correspondentes a cores diferentes. Quatro desses LEDs foram usados no presente estudo: verde (523 nm, com coordenadas do diagrama CIE- Comissão internacional de iluminação (CIE1931): $x = 0,2016$, $y = 0,7371$); laranja (594 nm, CIE1931: $x = 0,5753$, $y = 0,4240$); azul (469 nm, CIE1931: $x = 0,1255$, $y = 0,0926$) e vermelho (638 nm, CIE1931: $x = 0,6957$, $y = 0,2966$). A luminância média foi 284 cd/m^2 (com luminância de cada LED: verde 40 cd/m^2 , laranja 160 cd/m^2 , azul 4 cd/m^2 e vermelho 80 cd/m^2) para todos os protocolos resultando em uma cromaticidade média avermelhada com coordenadas do diagrama CIE1931: $x = 0.5951$, $y = 0.3857$.

As medições de luminância foram feitas utilizando um fotômetro Minolta (LS-110). Os espectros dos estímulos e as coordenadas CIE foram medidas utilizando um espectrorradiômetro CAS 140 (Instrument Systems, Munique, Alemanha). Foram realizados oito protocolos de estimulação: isolamento em cone L, isolamento em cone M, isolamento da via de luminância e isolamento da via de cor vermelho-verde, cada um com frequências temporais de 12 e 36 Hz, cujas especificações são apresentadas na Tabela 1.

O isolamento de cone L ou de cone M realizado no presente estudo foi obtido utilizando o método de tripla substituição silenciosa (KREMERS, 2003). As respostas de cone L foram isoladas com contraste de cone L de 19%, com cone M, cone S e bastonetes “silenciados” (isto é, 0% de modulação). Enquanto que o isolamento de cone M foi realizado com contraste de cone M de 18%, com cone L, cone S e bastonetes “silenciados”. Estes estímulos foram apresentados à 12 e 36 Hz (estímulos tipo *flicker* com modulação senoidal do campo de adaptação) para avaliar separadamente as contribuições das vias retino-geniculadas cromática e de luminância, respectivamente (KREMERS; LINK, 2008).

Medidas adicionais com estímulos de ativação seletiva de mecanismo de luminância (Lum) e estímulos de ativação de mecanismo cromático vermelho-verde (Crom) foram também realizadas, à 12 e 36 Hz. Nos estímulos isocromáticos de luminância, todos os quatro LEDs foram moduladas em fase com 75% de contraste de luminância. Os estímulos cromáticos vermelho-verde foram obtidos com a modulação em contra-fase dos LEDs vermelho e verde (LEDs azul e laranja não foram modulados). A modulação do contraste foi de 100% para os LEDs verdes e 50% para LEDs vermelhos para obter estímulos isoluminantes considerando que a luminância média do LED vermelho ($80 \text{ cd} / \text{m}^2$) foi o dobro da do LED verde ($40 \text{ cd} / \text{m}^2$). Devido à variação individual nas condições de isoluminância, a estimulação de luminância residual pode estar presente. Contudo, dados anteriores mostraram que com estas condições de estimulação a resposta do ERG a conteúdos cromáticos do estímulo domina à 12 Hz (KREMERS et al., 2010). A figura 21 mostra os estímulos utilizados nos diferentes protocolos de estimulação e a tabela 1 apresenta as condições de estimulação.

Tabela 1. Condições de estimulação.

LED	Estímulos			
	Cone L	Cone M	Via de Luminância isocromática	Via de cor isoluminante
Luminância média (cd/m ²)	284	284	284	284
Luminância (cd/m²)				
Verde	40	40	40	40
Laranja	160	160	160	160
Azul	4	4	4	4
Vermelho	80	80	80	80
Contraste dos LEDs (%)*				
Verde	5.0	-20	75	-100
Laranja	-22	59	75	0
Azul	-1	0	75	0
Vermelho	90	-90	75	50
Contraste de fotorreceptor (%)*				
Cone L	19	0	75	6.5
Cone M	0	18	75	-18.5
Cone S	0	0	75	-9.0
Bastonete	0	0	75	-48.3
Frequência (Hz)				
	12	12	12	12
	36	36	36	36

A tabela 1 mostra a luminância e contraste dos LEDs (verde, laranja, azul e vermelho), contraste de fotorreceptor (cone L, M, S e bastonete), e frequência temporal de estimulação (12 e 36 Hz) utilizados em cada tipo de estimulação (isolamento de cone L, isolamento de cone M, isolamento do mecanismo de luminância e isolamento do mecanismo cromático).

*: Contrastes com sinais opostos indicam modulação em contra-fase.

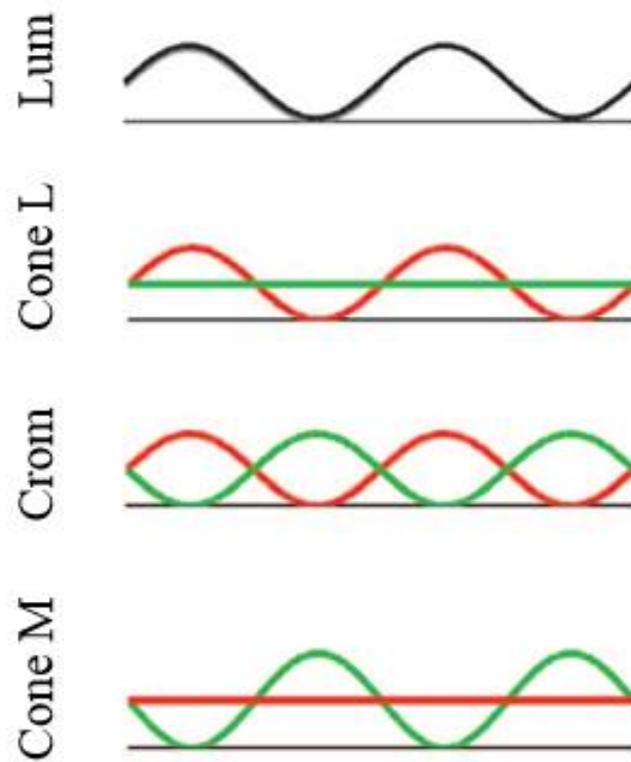


Figura 21. Representação dos quatro diferentes tipos de estimulação utilizadas nos experimentos. Cone M: estímulo de isolamento de cone M; Crom: estímulo de isolamento de mecanismo cromático; Cone L: estímulo de isolamento de cone L; Lum: estímulo de isolamento de mecanismo de luminância (Adaptado de LEE; SUN, 2009).

3.3 REGISTROS ELETRORRETINOGRÁFICOS

Os ERGs foram medidos no olho direito de cada indivíduo. Evitando, assim, qualquer seleção como “olho dominante”. Após dilatação da pupila com uma gota de 0,5% de tropicamida, os eletrodos de disco de ouro com pasta condutora (DO Weaver e Co, EUA) foram fixados à testa e à têmpora ipsilateral ao olho testado como eletrodos terra e de referência, respectivamente (figura 22). As áreas da pele foram limpas com gel abrasivo Nuprep (DO Weaver & Company, EUA) antes do posicionamento dos eletrodos. O eletrodo ativo utilizado foi o DTL (Dawson, Trick e Litzkow) que consiste em um fino fio de *nylon* o qual foi posicionado na conjuntiva inferior fixado próximo aos cantos temporal e nasal do olho (figura 22). A anestesia corneana não foi solicitada por nenhum dos indivíduos e as impedâncias dos eletrodos foram mantidas abaixo de 5 k Ω .

Antes de cada um dos oito protocolos de estimulação visual, os sujeitos foram adaptados ao escuro por 30 minutos, já com os eletrodos posicionados, na sala experimentação com todas as luzes apagadas e ambos os olhos vendados com tapa-olho. Logo após, apenas o olho direito foi descoberto para ser testado e o esquerdo permaneceu tampado. Foi solicitado aos indivíduos que fixassem a visão em um pequeno ponto vermelho central no interior da cúpula para garantir a fixação estável. Suas cabeças foram estabilizadas pela testa e queixo apoiados em frente a cúpula de *Ganzfeld*.

Após o período de adaptação ao escuro a luz de fundo do campo de adaptação da cúpula de *Ganzfeld* foi ligada e os registros iniciaram-se com o passar de 30 (registro nomeado 'tempo 0' ou “t0”). Este tempo foi necessário para minimizar os estrabismos e os artefatos de piscadas devido ao desconforto visual gerado pela súbita mudança de intensidade de iluminação. Os registros foram realizados de 2 em 2 minutos até decorrerem 16 minutos, totalizando 9 registros ao longo do tempo de adaptação ao claro (tempos: 0 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 12 min, 14 min e 16 min). Um registro médio consistiu em 40 varreduras, cada uma com duração de 1 segundo. As respostas foram amplificadas 100.000 vezes, filtradas com filtro passa-banda entre 1 e 300 Hz e digitalizados a uma taxa de 1024 Hz.

A ordem dos oito protocolos de estimulação visual foi aleatória e cada um dos protocolos (incluindo a adaptação ao escuro de 30 min) levava aproximadamente 47 minutos para ser concluído. Dessa forma, foram necessárias várias sessões de registro (de até no máximo quatro protocolos por dia) para cada sujeito.

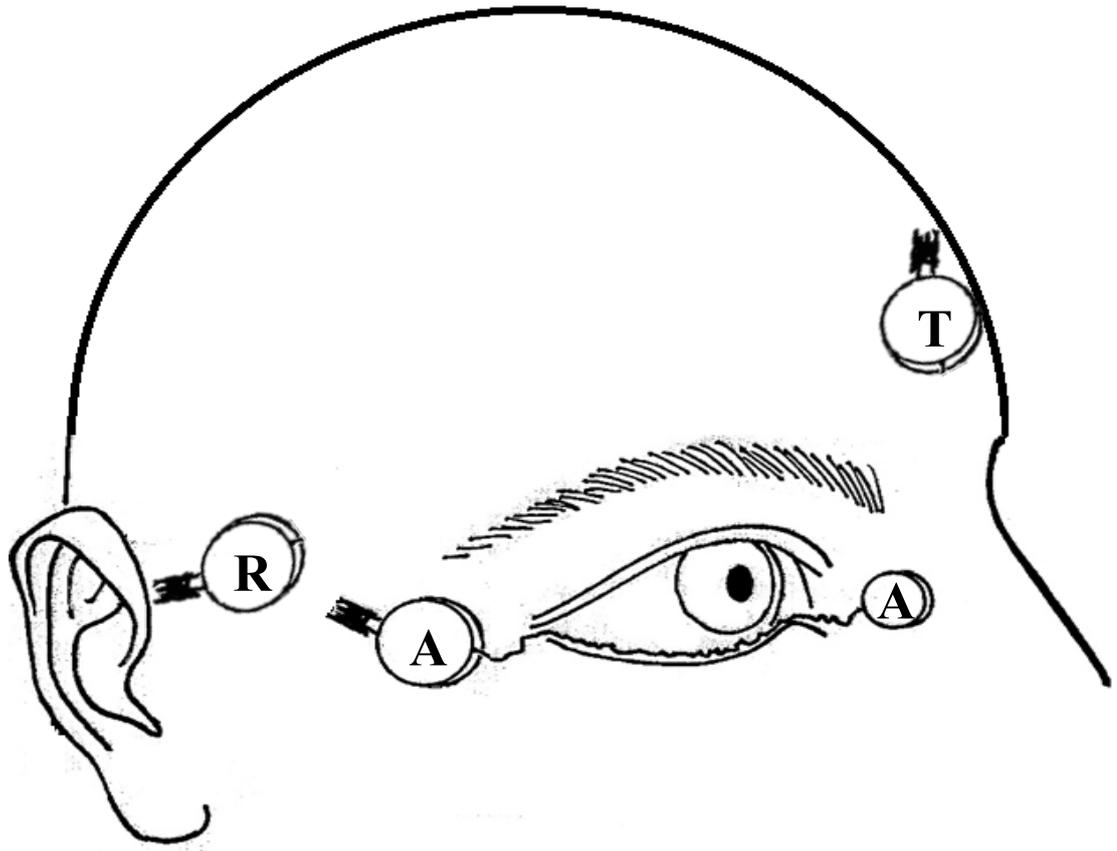


Figura 22. Posicionamento dos eletrodos. T: eletrodo terra, fixado à testa; R: eletrodo referência, fixado à têmpora ipsilateral ao olho testado. A: eletrodo ativo tipo DTL, posicionado na conjuntiva inferior próximo aos cantos temporal e nasal do olho (Adaptado de <http://www.chip.rlbuht.nhs.uk/Medical%20Physics%20and%20Clinical%20Engineering/Pages/ERG%20Electrode.aspx>. Acesso em 12/07/2017)

3.4 PROCESSAMENTO DOS DADOS

As respostas do ERG foram analisadas por Transformada Rápida de Fourier utilizando o programa MATLAB (versão R2011b, Mathworks, MA, EUA) para obter amplitudes e fases dos componentes primeiro harmônicos (F), segundo harmônico (2F) e terceiro harmônico (3F).

As formas de onda das respostas eletrorretinográficas em cada condição de estimulação foram analisadas calculando a média dos registros individuais nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 minutos de adaptação à luz. As possíveis mudanças de forma de onda das respostas são refletidas pelos espectros de amplitude das respostas ao ERG, os quais revelam como as amplitudes no domínio da frequência mudam ao longo do tempo. Os espectros individuais foram mediados para análise das respostas aos estímulos de isolamento de cone L, M, mecanismo cromático e de luminância à 12 e 36 Hz.

Para cada componente foi calculada a razão sinal-ruído (signal to noise ratio - SNR), que consiste em um parâmetro de confiabilidade dos dados a qual foi utilizada para os critérios de exclusão mencionados posteriormente. A SNR foi definida como as amplitudes na frequência de estímulo $Amp(f)$, 12 ou 36 Hz, dividida pela média das amplitudes nas frequências adjacentes, $Amp(f) \pm 1$ Hz (MEIGEN; BACH, 1999) Seguindo a Equação 1:

$$SNR = \frac{2 * Amp(f)}{Amp(f - 1) + Amp(f + 1)}$$

Onde $Amp(f)$ é a amplitude na a frequência de estimulação (12 ou 36 Hz), $Amp(f-1)$ é amplitude na frequência de estimulação -1 Hz (11 ou ;35 Hz) e $Amp(f+1)$ é amplitude correspondente a frequência de estimulação +1 Hz (13 ou 37 Hz). A SNR foi usada como critério de exclusão de dados das análises como descrito a posteriori.

Para cada condição de estimulação foi calculado amplitude e fase relativas do ERG. A amplitude relativa foi obtida através da razão entre a amplitude em cada tempo e a amplitude encontrada no tempo zero [$Amp(t) / Amp(t_0)$] e a fase relativa foi calculada a diferença entre a fase obtida em cada tempo e a fase encontrada no tempo zero [$Fase(t) - Fase(t_0)$]. A partir desses dados relativos individuais em função do tempo de adaptação à luz foi calculada a média e o desvio padrão para cada condição de estimulação.

Os dados médios de amplitude e fase relativas do ERG em função do tempo de adaptação à luz foram ajustados pela Equação 2 (ALEXANDER et al., 2006; MCANANY; NOLAN, 2014):

$$y(t) = y(0) + a \cdot \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right)\right)$$

Em que $y(t)$ é a amplitude ou fase de resposta em um determinado tempo de adaptação. $y(0)$ é a amplitude ou fase no tempo 0 min, primeira medição (30 segundos após a luz de adaptação ser ligada). a representa a variação da amplitude ou fase relativas ao longo do tempo de adaptação à luz; τ é a constante de tempo ou constante de semi-saturação, que corresponde à metade do tempo em que a curva de amplitude ou fase em função do tempo de adaptação à luz satura. Este modelo foi ajustado aos dados de variação de amplitude e fase ao longo do tempo de adaptação à luz usando o programa MATLAB para obter estimativas de $y(0)$, a , e τ .

Foram utilizados três critérios para a exclusão de dados da análise de variação de amplitude e fase relativas durante a adaptação à luz: (1) dados de fase não foram utilizados quando o SNR foi menor que 2 (MEIGEN; BACH, 1999) a não ser que fossem apenas ligeiramente inferiores a 2 e se encaixasse na curva formada pelas fases obtidas em outros tempos de adaptação em que a SNR fosse maior do que 2; (2) Todos os dados de fase de uma condição foram excluídos da análise de grupo quando a SNR em t0 min era menor que 2 e não se encaixava na curva; (3) Os dados de amplitude e fase não foram usados quando os ajustes obtidos pela equação 2 forneciam $\tau > 16$ min porque, nesse caso, os dados não forneciam uma linearidade.

Para comparar a magnitude de variação de amplitude entre os resultados dos diferentes tipos de cones (L e M) e dos diferentes mecanismos isolados (cromático e luminância) e nas diferentes frequências temporais (12 e 36 Hz) foi calculada a razão do maior valor de a pelo menor valor.

A razão de amplitude L/M foi, também, analisada. Essa análise permite a identificação de respostas com maior contribuição da via de oponência de cor (via P), cuja característica é o valor da razão se aproximar de uma unidade, ou da via que não apresenta oponência de cor (via M), cuja característica é apresentar valor resultante da razão L/M maior que 1. Essa razão foi calculada considerando os valores absolutos de amplitude de F para respostas de isolamento de cone L dividido pelos valores absolutos de amplitude de F para respostas de isolamento de cone M de cada sujeito em cada tempo de registro e calculando a média e erro padrão dessa razão para cada frequência temporal de estimulação utilizada (KREMERS et al., 2000; KREMERS; LINK, 2008; CHALLA et al., 2010; JACOB et al., 2015).

Ainda com o intuito de identificar as respostas com maior contribuição da via de oponência de cor foi analisada a diferença de fase entre as respostas conduzidas por cone L e conduzidas por cone M (L-M). Essa diferença foi calculada considerando os valores absolutos de fase de F para respostas de isolamento de cone L menos os valores absolutos de fase de F para respostas de isolamento de cone M de cada sujeito em cada tempo de registro e calculando a média e erro padrão dessa diferença para frequência temporal de 12 e 36 Hz. A diferença de fase L-M próxima a 180° indica oponência de cones L e M, refletindo atividade da via P (KREMERS et al., 2000; KREMERS; LINK, 2008; CHALLA et al., 2010; JACOB et al., 2015).

4. RESULTADOS

4.1 FORMAS DE ONDA E ESPECTRO DE ENERGIA

As médias das formas de onda individuais medidas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 minutos de adaptação à luz são apresentadas para cada condição de estimulação nas figuras 23 e 24. Em quase todas as condições as respostas aumentaram durante o tempo de adaptação à luz. Em algumas condições de estímulo (por exemplo, as respostas aos estímulos de isolamento de cone M à 36 Hz e à modulação cromática à 36 Hz), as respostas foram muito pequenas no tempo 0 min (t_0). Para outras condições, a razão sinal-ruído foi satisfatória já em t_0 . Em geral, a maioria das condições de estimulação gerou formas de onda senoidais simples que não mudaram ao longo do tempo de adaptação. Uma exceção foi a resposta à modulação de luminância à 12 Hz (figura 24, linha inferior, à esquerda), onde uma complexa forma de onda com dois máximos e dois mínimos foi encontrada.

Esta foi, também, a única condição de estimulação em que a forma de onda mudou distintamente ao longo do tempo e tornou-se mais complexa. Foi proposto anteriormente que a peculiar forma de onda das respostas de ERG aos estímulos senoidais de luminância é devido à presença de dois componentes (um "senoidal" e um "transiente") (BURNS et al., 1992; ODOM et al., 1992; KONDO; SIEVING, 2001; VISWANATHAN et al., 2002; PANGENI et al. 2010). Estas formas de onda indicam que estes componentes mudam com diferentes cursos de tempo durante a adaptação à luz.

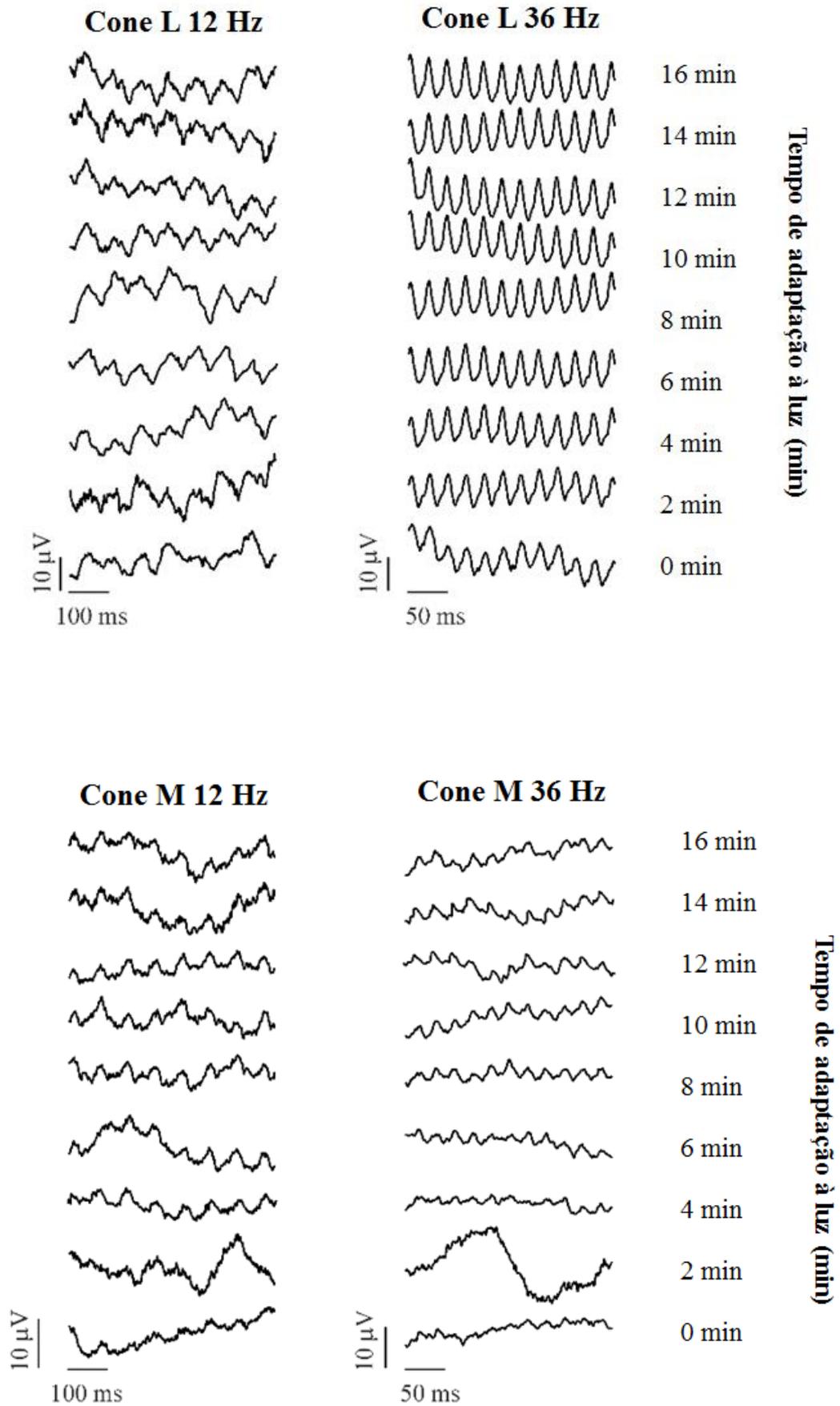


Figura 23. Média das formas de onda dos registros individuais para respostas à estímulos de isolamento de cone L e M em 12 Hz e 36 Hz, durante 16 min de adaptação à luz.

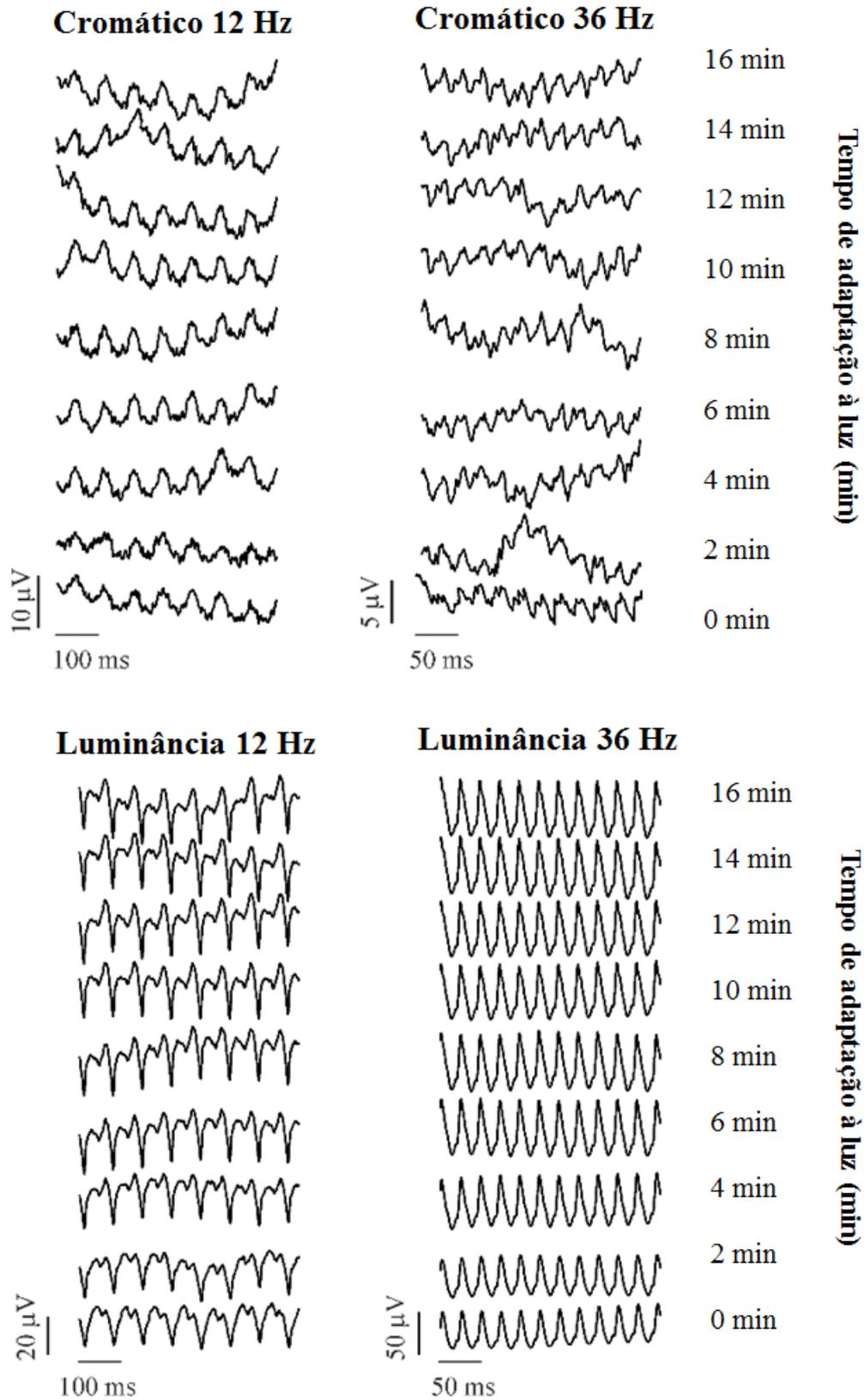


Figura 24. Média das formas de onda dos registros individuais para respostas à estímulos de isolamento de mecanismo cromático e de luminância em 12 Hz e 36 Hz, durante 16 min de adaptação à luz.

Os espectros de amplitude das respostas ao ERG revelam como as amplitudes no domínio da frequência mudam ao longo do tempo e refletem, assim, as possíveis mudanças de forma de onda das respostas.

As figuras 25 e 26 mostram os espectros de amplitude médios das respostas individuais correspondentes às formas de onda mostradas nas figuras 23 e 24 para estímulos de isolamento de cone L, M, mecanismo cromático e de luminância à 12 e 36 Hz. Os componentes F, 2 F e 3 F aparecem nessa ordem da esquerda para a direita nos gráficos. A maioria das respostas foram dominadas (maior amplitude) pelo componente F que aumentou ao longo do tempo, com duas exceções. Uma delas foi o componente F da resposta de mecanismo cromático à 36 Hz que pareceu não apresentar aumento considerável de amplitude nos 16 min de adaptação (figura 26). A segunda exceção foi para o mecanismo de luminância à 12 Hz, no qual a resposta foi dominada pelo componente 2 F na maioria dos tempos de registro, ou seja, apresentando maior amplitude que F. O componente F foi maior que 2 F apenas nos tempos 0 e 2 min ao passo que 2 F torna-se maior que F nos outros pontos de tempo porque a amplitude de F diminuiu ao longo do tempo enquanto a amplitude de 2F aumentou. Isto reflete as alterações de forma de onda acima mencionadas observadas para esta condição (figura 24).

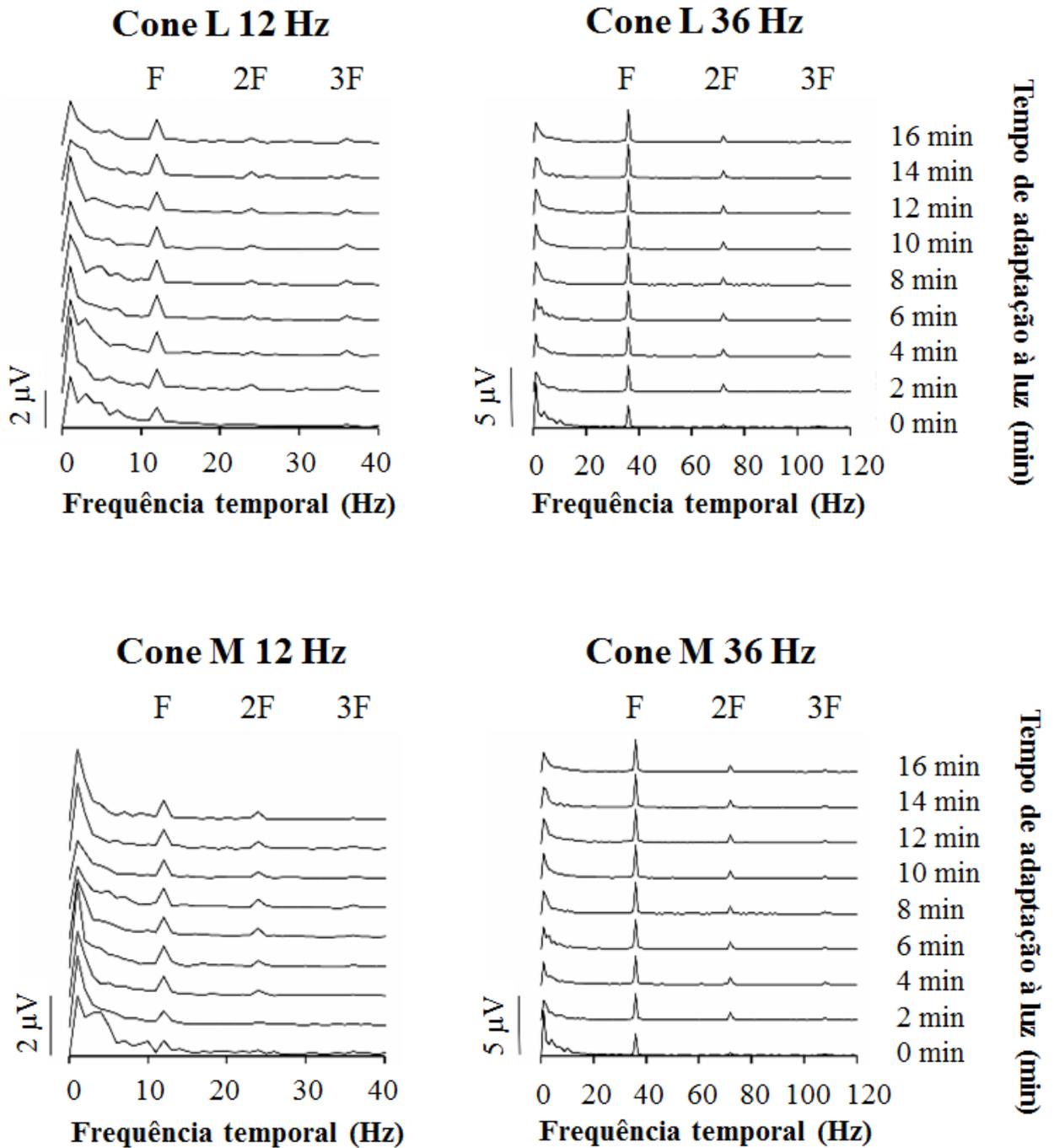


Figura 25. Média de distribuição de amplitude dos harmônicos para respostas à estímulo de isolamento de cone L e M em 12 Hz e 36 Hz, ao longo de 16 minutos de adaptação à luz.

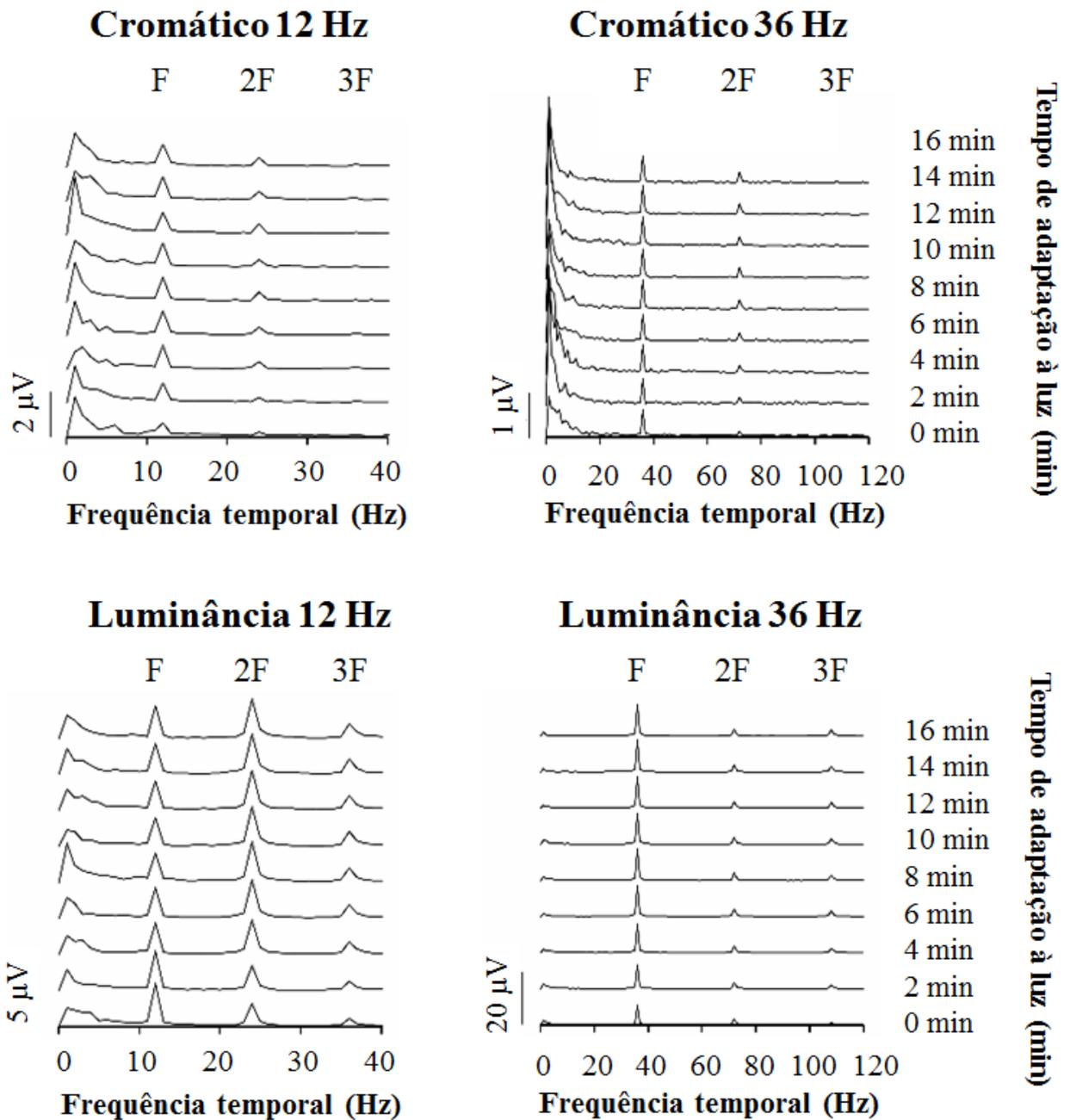


Figura 26. Média de distribuição de amplitude dos harmônicos para respostas à estímulo de isolamento de mecanismo cromático e de luminância em 12 Hz e 36 Hz, ao longo de 16 minutos de adaptação à luz.

4.2 VARIAÇÃO DE AMPLITUDE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO À LUZ

As médias e desvios padrão das amplitudes relativas dos componentes F, 2F e 3F das respostas a estímulos de isolamento de cone L, cone M, mecanismo cromático e mecanismo de luminância do ffERG em função do tempo de adaptação à luz são apresentadas na figura 27, 28, 29 e 30 respectivamente. A amplitude relativa corresponde à razão entre o valor de amplitude em cada tempo e a amplitude inicial (em t_0) de cada indivíduo em cada tipo de estimulação. A partir da equação 2 aplicada aos valores médios de variação de amplitude durante o tempo de adaptação à luz obteve-se o ajuste (correspondente à linha vermelha nos gráficos) e valores de a (variação) e τ (constante de tempo) mostrados da tabela 2 e 3, respectivamente.

As amplitudes relativas médias dos componentes F, 2F e 3F do ffERG conduzido pelo cone L aumentaram durante o período de adaptação fotópica em 12 e 36 Hz. Quanto maior o harmônico maior o valor de a para ambas as frequências temporais ($F < 2F < 3F$). Observou-se que, à 36 Hz, o aumento da amplitude foi maior do que à 12 Hz para todos os componentes em uma razão média de $1,9 \pm 0,3$.

Assim como no ffERG de cone L, as amplitudes relativas médias dos componentes F e 2F para as respostas conduzidas pelo cone M também aumentaram durante o período de adaptação fotópica em 12 e 36 Hz, porém a amplitude relativa média para 3F não teve variação ou apresentou pequena variação durante período de adaptação. À 12 Hz, os valores médios de a para F e 2F foram semelhantes, mas à 36 Hz, o valor de F foi maior do que 2F. Para a amplitude relativa média do componente F de cone M, o valor a foi maior em 36 Hz do que em 12 Hz (razão de 1,6), enquanto que para 2F a variação de amplitude foi maior na condição de 12 Hz do que no estímulo de 36 Hz (razão de 1,3).

A comparação entre os valores de valores de a estimados a partir do ffERG conduzido por cone L e M mostrou que o componente F de cone M foi maior do que F de cone L tanto à 12 Hz quanto à 36 Hz (razão de cerca de 3,5). Para o componente 3F, ocorreu o inverso, a amplitude conduzida pelo cone L aumentou fortemente durante a adaptação à luz, enquanto que as respostas de cone M à 12 e 36 Hz não apresentaram considerável variação de amplitude. Para 2F, o crescimento da amplitude relativa à 12 Hz foi maior para o ffERG do cone M do que para o ffERG do cone L (razão de 1,7), e à 36 Hz ocorreu o inverso (razão de 1,8).

Para o estímulo cromático, houve dois componentes que não apresentaram variação de amplitude (F à 36 Hz e 3F à 12 Hz) provavelmente porque as respostas foram muito pequenas

(pouco acima do ruído) durante os registros. O valor de a para $2F$ foi maior do que para os outros harmônicos à 12 e 36 Hz (razão acima de 2,5).

Para o estímulo de luminância, o componente F em 12 Hz mostrou uma diminuição concomitante com um aumento no componente $2F$ (razão de 2,88). Isso reflete a complexa variação na forma de onda observada na figura 24 provavelmente relacionada a presença de dois componentes (um senoidal e um transiente) nesse tipo de resposta (BURNS et al., 1992; ODOM et al., 1992; KONDO; SIEVING, 2001; VISWANATHAN et al., 2002; PANGENI et al. 2010). O valor de a para $3F$ foi maior do que para os outros harmônicos à 12 e 36 Hz (razão acima de 1,3). Não houve variação considerável de amplitude para $2F$ à 36 Hz.

Comparando as respostas a estímulos de isolamento de mecanismos de luminância e cromático pôde-se observar que o aumento de amplitude (a) para o estímulo cromático foi maior do que para o estímulo de luminância para F à 12 Hz (razão de 2,2), $2F$ à 12 Hz (razão de 1,8) e à 36 Hz (razão de 57), enquanto o inverso foi observado para $3F$ à 36 Hz (razão de 3). Como os componentes F à 36 Hz e $3F$ à 12 Hz não apresentaram variação de amplitude, não foi possível compará-los com os resultados de luminância para esses componentes.

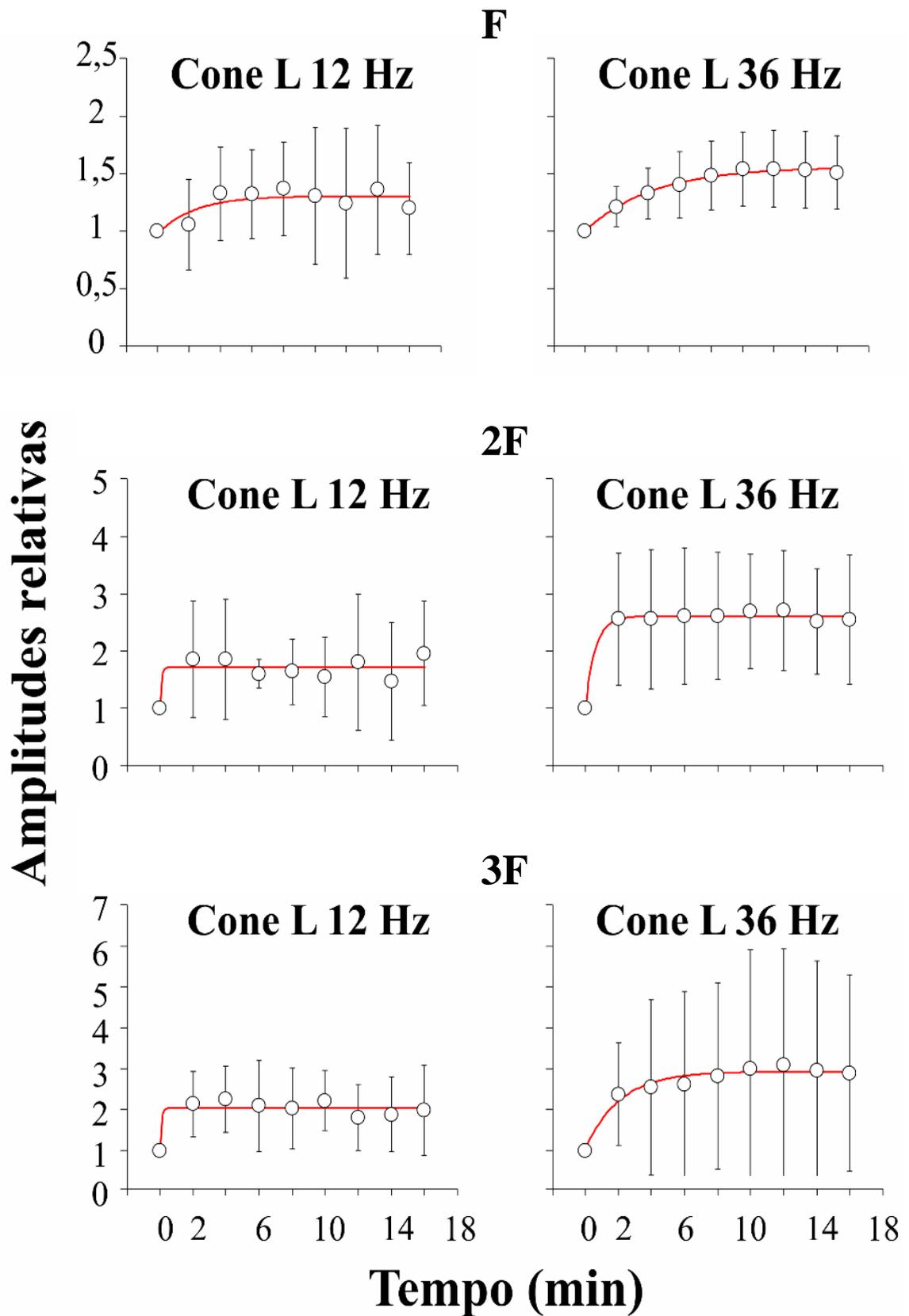


Figura 27. Variação de amplitude da resposta eletrorretinográfica ao *flicker* de isolamento de cone L em função do tempo de adaptação à luz. Dados apresentados como média e desvio padrão dos valores individuais de amplitude relativa em cada tempo de registro para cada componente da resposta, primeiro (F), segundo (2F) e terceiro harmônico (3F) nas frequências temporais de 12 e 36 Hz. A linha vermelha representa o ajuste obtido pela equação 2.

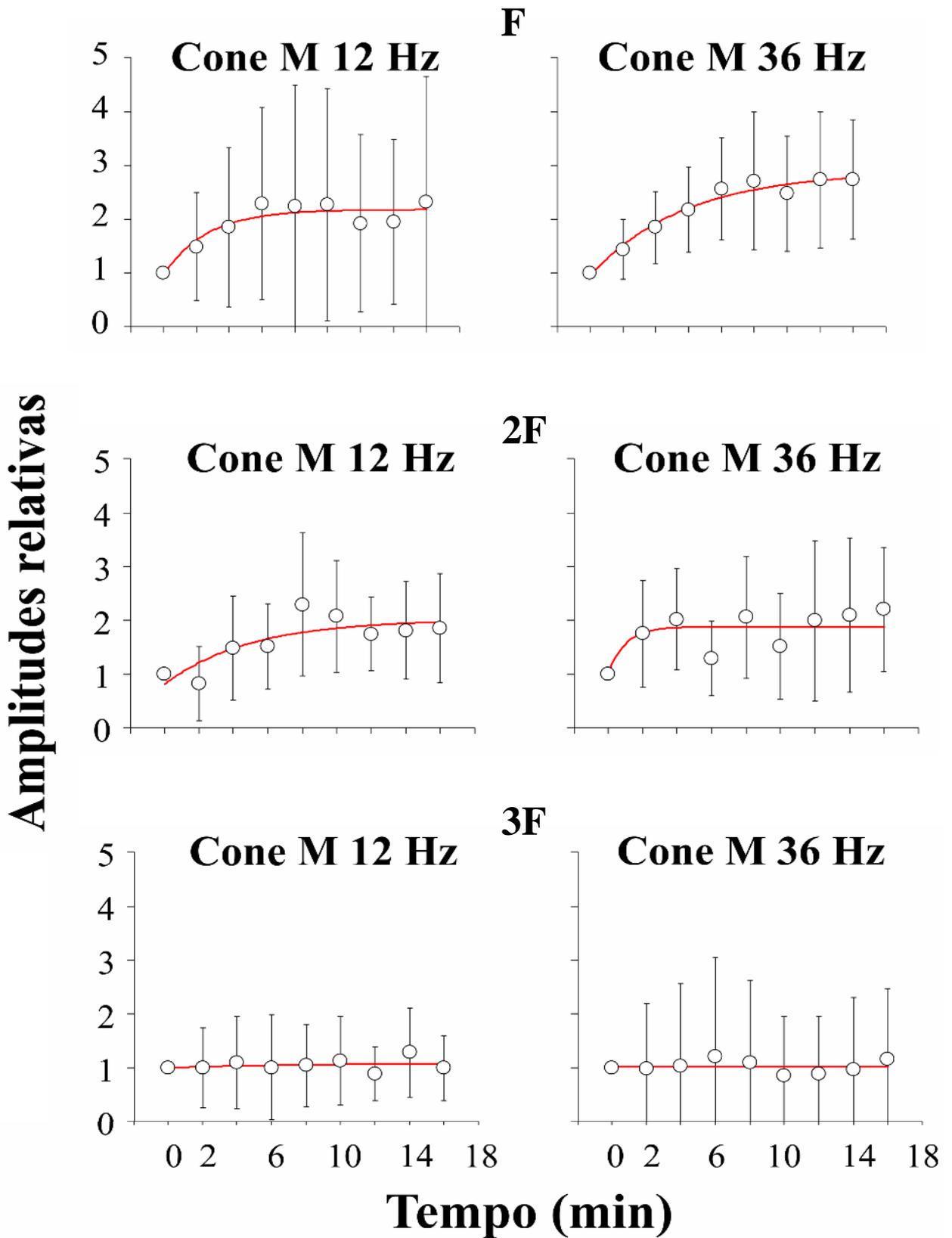


Figura 28. Variação de amplitude da resposta eletroretinográfica ao *flicker* de isolamento de cone M em função do tempo de adaptação à luz. Dados apresentados como média e desvio padrão dos valores individuais de amplitude relativa em cada tempo de registro para cada componente da resposta, primeiro (F), segundo (2F) e terceiro harmônico (3F) nas frequências temporais de 12 e 36 Hz. A linha vermelha representa o ajuste obtido pela equação 2.

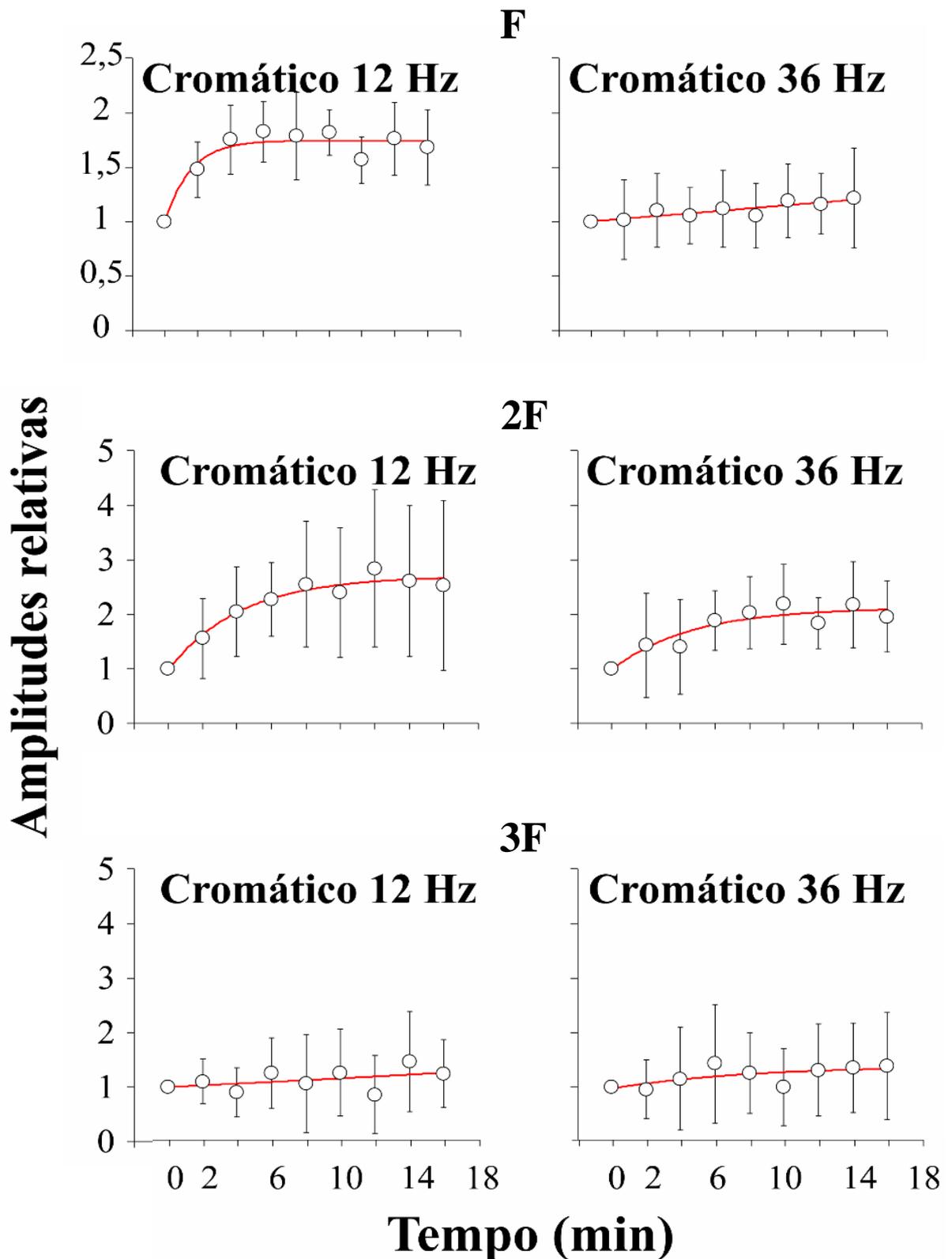


Figura 29. Variação de amplitude da resposta eletroretinográfica ao *flicker* de isolamento de mecanismo cromático em função do tempo de adaptação à luz. Dados apresentados como média e desvio padrão dos valores individuais de amplitude relativa em cada tempo de registro para cada componente da resposta, primeiro (F), segundo (2F) e terceiro harmônico (3F) nas frequências temporais de 12 e 36 Hz. A linha vermelha representa o ajuste obtido pela equação 2.

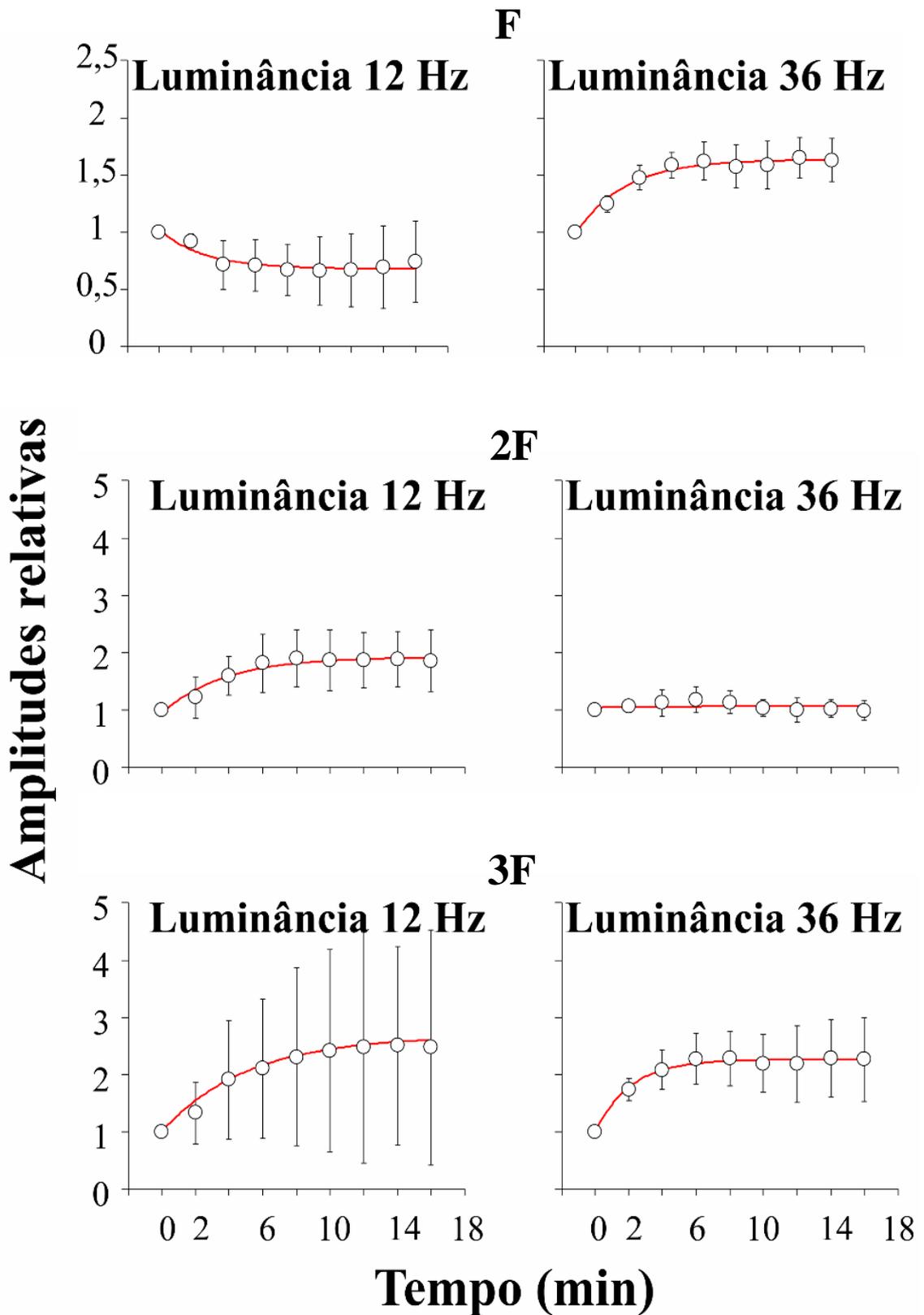


Figura 30. Variação de amplitude da resposta eletrorretinográfica ao *flicker* de isolamento de mecanismo de luminância em função do tempo de adaptação à luz. Dados apresentados como média e desvio padrão dos valores individuais de amplitude relativa em cada tempo de registro para cada componente da resposta, primeiro (F), segundo (2F) e terceiro harmônico (3F) nas frequências temporais de 12 e 36 Hz. A linha vermelha representa o ajuste obtido pela equação 2.

4.3 VARIAÇÃO DE FASE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO À LUZ

A fase foi analisada pela subtração entre o valor de fase nos diferentes tempos e a fase no tempo 0. As médias e desvios padrão desses valores individuais dos componentes F, 2F e 3F das respostas a estímulos de isolamento de cone L, cone M, mecanismo cromático e mecanismo de luminância do ffERG em função do tempo de adaptação à luz são apresentadas na figura foram plotados nos gráficos apresentados nas figuras 31, 32, 33, e 34, respectivamente. A equação 2 foi, então, aplicada aos valores médios de variação de fase ao longo do tempo de adaptação à luz para obtenção do ajuste (correspondente à linha vermelha dos gráficos) e valores de valores de a (variação) e τ (constante de tempo) mostrados da tabela 2 e 3, respectivamente.

Para a maioria das condições de estimulação houve aumento na fase ao longo do tempo de adaptação fotópica. O componente F apresentou pouca variação de fase (a) em todas as condições (no máximo 30 graus). As mudanças nos componentes 2F e 3F foram geralmente maiores (entre 36,3 e 124 graus). Os resultados mostraram que, em geral, em 36 Hz o aumento de fase foi maior do que em 12 Hz. A variação de fase do componente F foi ligeiramente maior para o cone L do que o cone M em 12 e 36 Hz. O mesmo ocorreu para 2F à 36 Hz, enquanto o cone M apresentou maior valor de a que o cone L para 2F à 12 Hz e 3F à 12 Hz. Os componentes que não apresentaram variação de fase foram: F de mecanismo de luminância à 12 Hz; 3F de mecanismo cromático, cone L e M à 36 Hz.

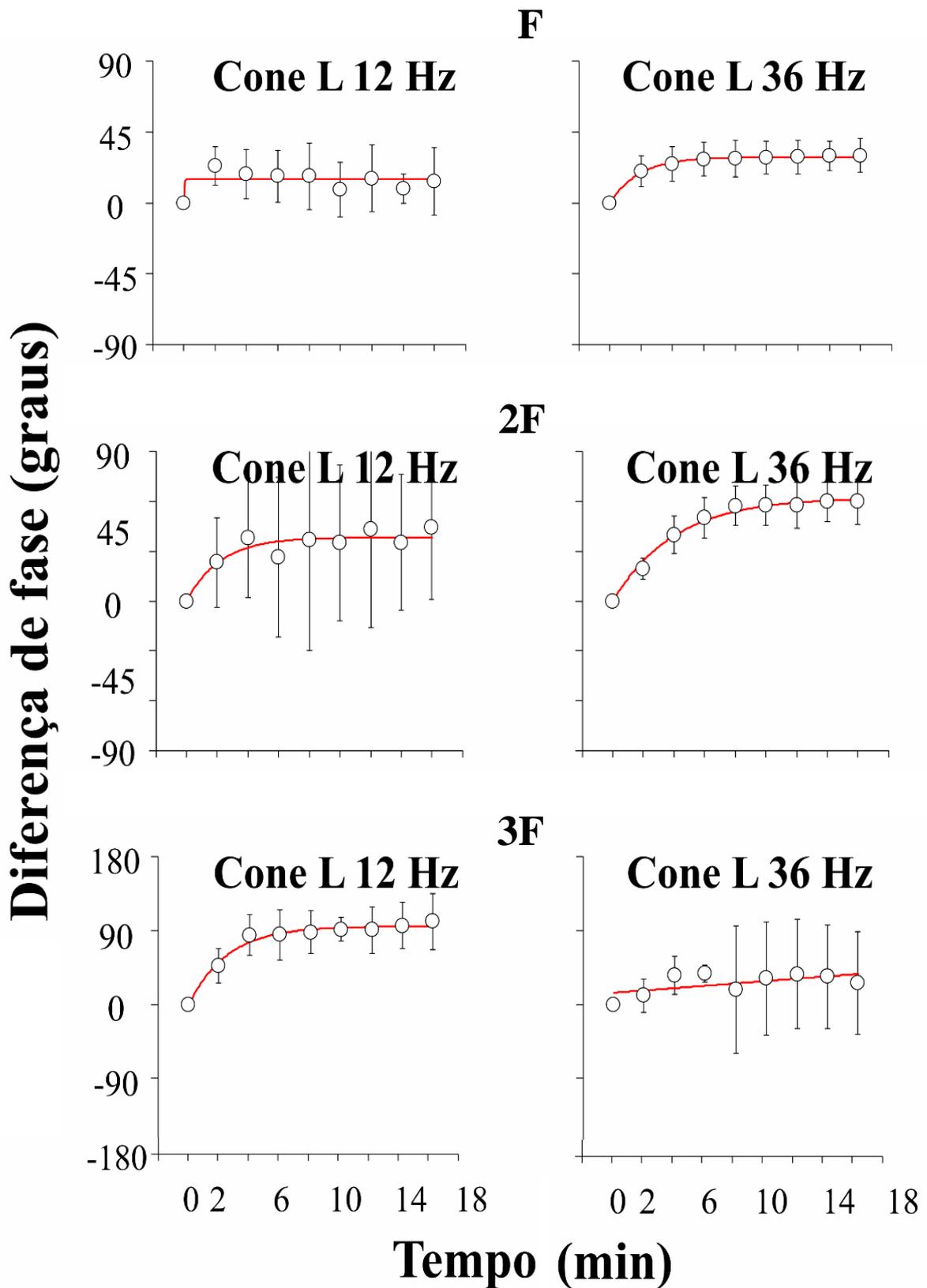


Figura 31. Variação de fase da resposta eletrorretinográfica ao *flicker* de isolamento de cone L em função do tempo de adaptação à luz. Dados apresentados como média e desvio padrão dos dados individuais de diferença de fase em relação a fase obtida no tempo zero (em graus) para cada tempo de registro para cada componente da resposta, primeiro (F), segundo (2F) e terceiro harmônico (3F) nas frequências temporais de 12 e 36 Hz. A linha vermelha representa o ajuste obtido pela equação 2.

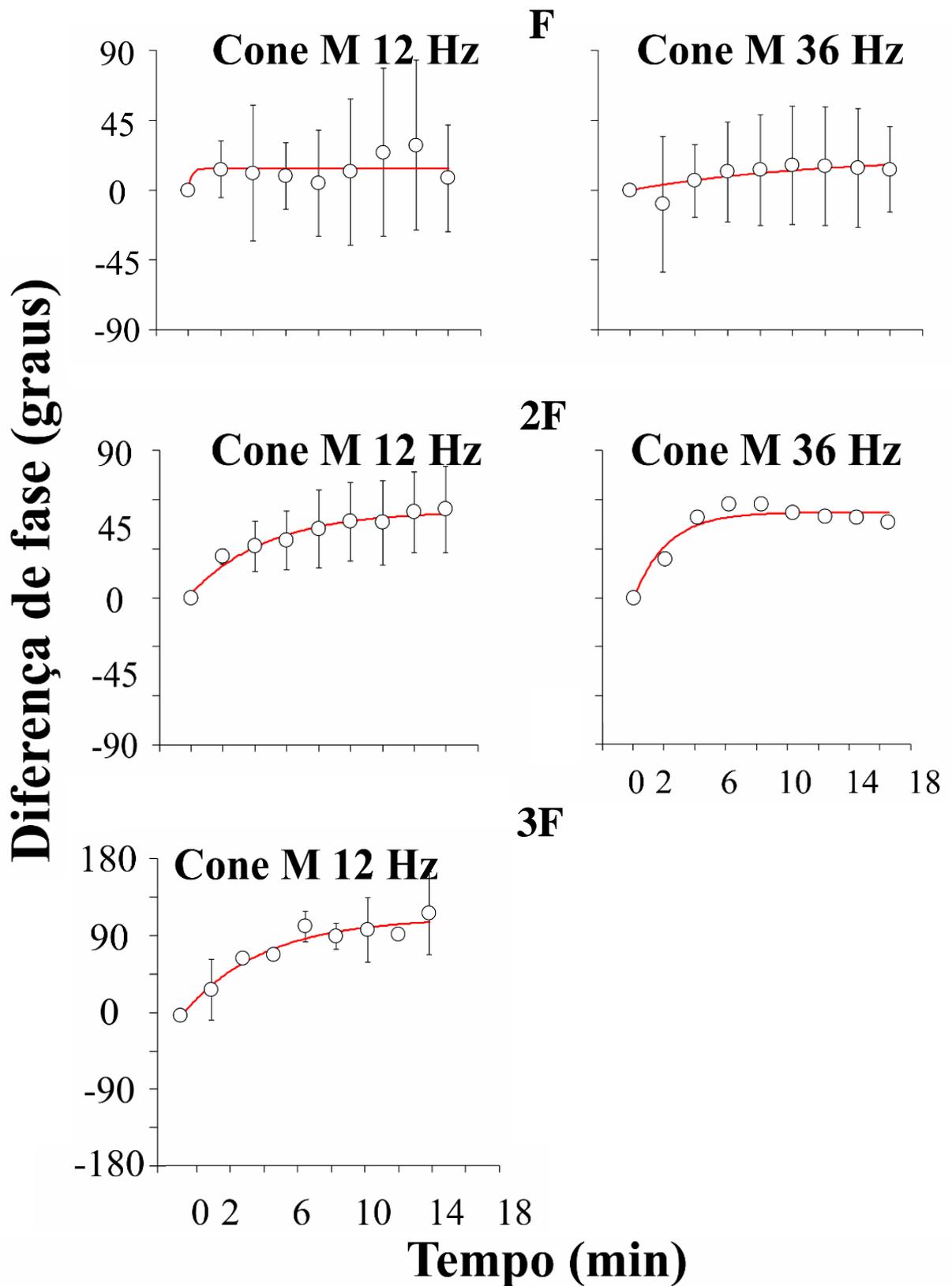


Figura 32. Variação de fase da resposta eletroretinográfica ao *flicker* de isolamento de cone M em função do tempo de adaptação à luz. Dados apresentados como média e desvio padrão dos dados individuais de diferença de fase em relação a fase obtida no tempo zero (em graus) para cada tempo de registro para cada componente da resposta, primeiro (F), segundo (2F) e terceiro harmônico (3F) nas frequências temporais de 12 e 36 Hz. A linha vermelha representa o ajuste obtido pela equação 2. Os dados de 3F de cone M à 36 Hz não são mostrados pois não foram confiáveis por apresentarem baixa razão sinal ruído (ver critérios para a exclusão de dados).

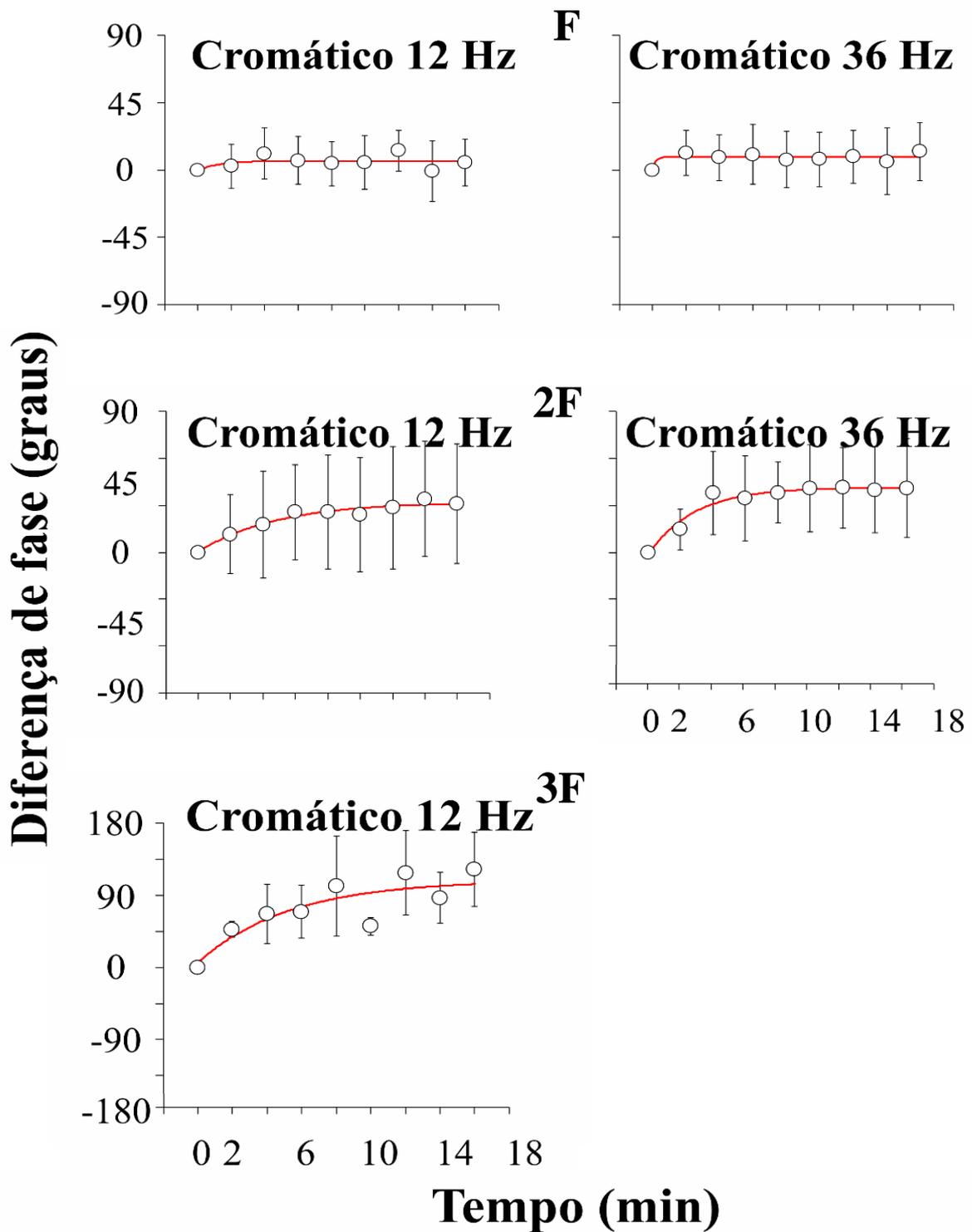


Figura 33. Variação de fase da resposta eletroretinográfica ao *flicker* de isolamento de mecanismo cromático em função do tempo de adaptação à luz. Dados apresentados como média e desvio padrão dos dados individuais de diferença de fase em relação a fase obtida no tempo zero (em graus) para cada tempo de registro para cada componente da resposta, primeiro (F), segundo (2F) e terceiro harmônico (3F) nas frequências temporais de 12 e 36 Hz. A linha vermelha representa o ajuste obtido pela equação 2. Os dados de 3F de mecanismo cromático à 36 Hz não são mostrados pois não foram confiáveis por apresentarem baixa razão sinal ruído (ver critérios para a exclusão de dados).

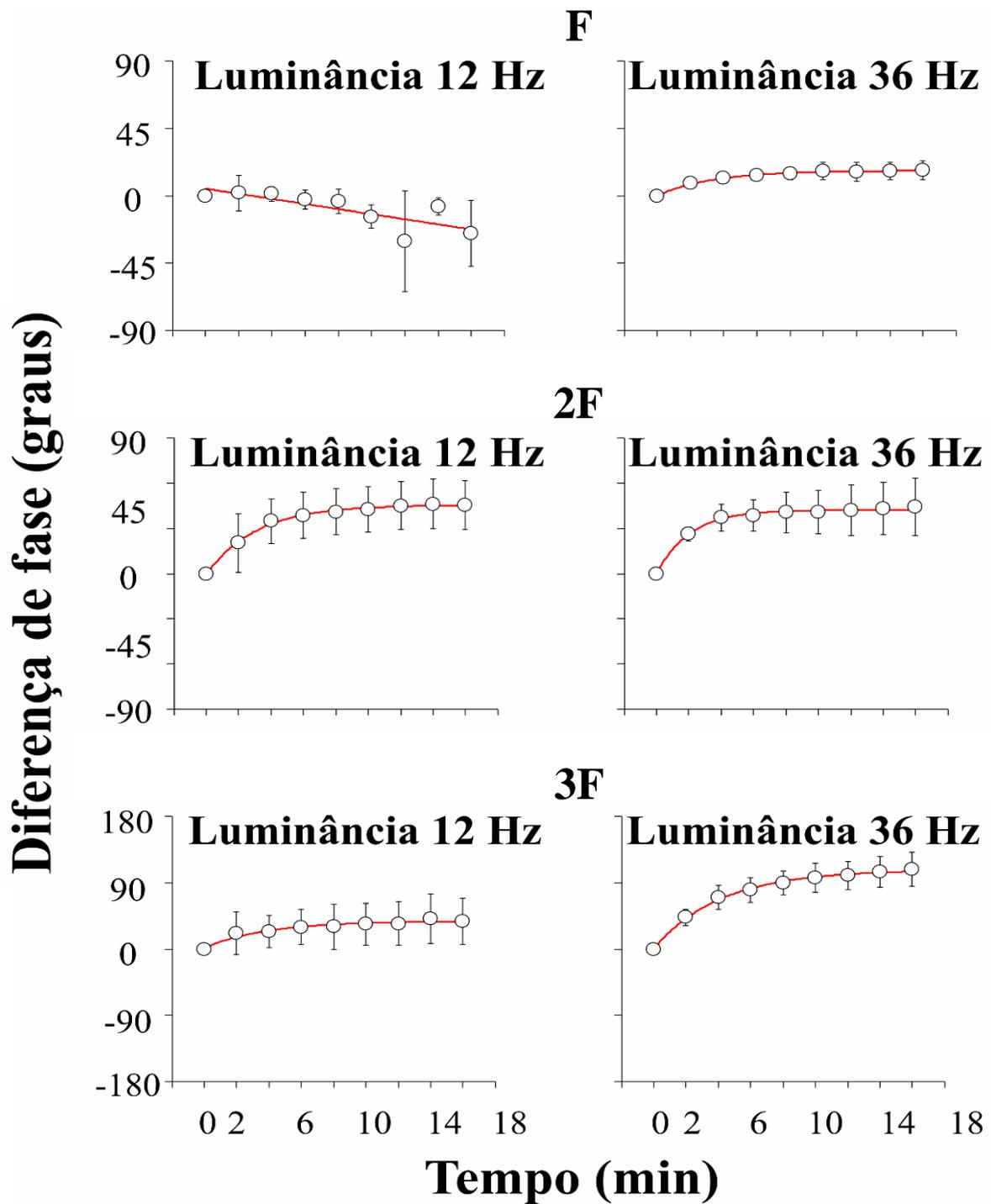


Figura 34. Variação de fase da resposta eletroretinográfica ao *flicker* de isolamento de isolamento de mecanismo de luminância em função do tempo de adaptação à luz. Dados apresentados como média e desvio padrão dos dados individuais de diferença de fase em relação a fase obtida no tempo zero (em graus) para cada tempo de registro para cada componente da resposta, primeiro (F), segundo (2F) e terceiro harmônico (3F) nas frequências temporais de 12 e 36 Hz. A linha vermelha representa o ajuste obtido pela equação 2.

Tabela 2. Variação (a) média de amplitude e fase (graus) dos componentes F, 2F e 3F durante a adaptação à luz para cada tipo de resposta eletroretinográfica analisada.

Tipos de resposta	Componentes Harmônicos					
	F		2F		3F	
	Amplitude	Fase	Amplitude	Fase	Amplitude	Fase
Cone L-12 Hz	0,33	15,38	0,71	57,25	1,04	96,55
Cone L-36 Hz	0,55	29,16	1,6	93,93	1,89	-
Cone M-12 Hz	1,21	13,87	1,2	76,13	0,08	124,63
Cone M-36 Hz	1,94	21,68	0,88	78,67	0	-
Cromático-12 Hz	0,76	6,3	1,73	48,21	-	103,17
Cromático-36 Hz	-	8,95	1,14	64,31	0,42	-
Luminância-12 Hz	-0,34	-	0,98	68,97	1,67	36,35
Luminância-36 Hz	0,65	16,62	0,02	63,65	1,27	106,66

- Condições com $\tau > 16$ min, ou seja, os dados não apresentaram uma variação linear durante a adaptação à luz.

4.4 ANÁLISE DAS CONSTANTES DE TEMPO DE ADAPTAÇÃO À LUZ

As constantes de tempo (τ) estimadas para as variações de amplitude e fase dos componentes F, 2F e 3F ao longo do período de adaptação à luz são apresentadas na tabela 3. Para as respostas eletrorretinográficas conduzidas pelo cone L, as constantes de tempo estimadas para amplitude do componente F foram maiores do que as estimadas para 2F e 3F enquanto que para fase os valores de τ foram menores para F que para os outros componentes. Quanto à influência da frequência temporal, as constantes de tempo estimadas a partir do ffERG de cone L foram maiores em 36 Hz do que em 12 Hz para amplitude e fase, ou seja, em 36 Hz a adaptação à luz foi mais lenta.

Para ffERG de cone M com estimulação de 12 Hz, as constantes de tempo do componente 3F foram maiores do que as do componente 2F que foram maiores do que as do componente F tanto para amplitude quanto para fase. Já em 36 Hz, F e 3F apresentaram valores semelhantes de constante de tempo e foram maiores do que as constantes de tempo de 2F para amplitude enquanto para fase obteve-se para valores de τ $F > 3F > 2F$. Apenas para o componente F, amplitude e fase, as constantes de tempo estimada em 36 Hz foram maiores do que em 12 Hz. Para 2F e 3F o resultado foi oposto, com exceção da fase de 3F cujas constantes de tempo foram semelhantes nas duas frequências temporais. As constantes de tempo estimadas para mudanças de F, 2F e 3F foram maiores para as respostas conduzidas por cone M do que por cone L para amplitude e fase, com exceção da fase do componente 2F à 36 Hz.

As amplitudes dos componentes F e 3F do ERG de mecanismo cromático à 36 e 12 Hz, respectivamente, não apresentaram consideráveis variações de amplitude durante o período de adaptação fotópica, logo, não foi possível estimar a constante de tempo, assim como a fase do componente 3F à 36 Hz. Em geral, as constantes de tempo de 3F de mecanismo cromático apresentaram valores maiores do que as constantes de tempo de 2F, cujos valores de τ foram maiores que F para amplitude e fase em ambas frequências temporais.

Para a condição de luminância à 12 Hz, observou-se que as constantes de tempo foram maiores para 3F em comparação com os componentes 2F e F para amplitude e fase. Já à 36 Hz, as constantes de tempo dos componentes F e 2F foram maiores do que as de 3F para amplitude enquanto para fase obteve-se $3F > F > 2F$. Quanto a influência da frequência temporal nas constantes de tempo das condições de luminância, para amplitude de F e fase de 3F, os valores de constante de tempo estimados em 12 e 36 Hz foram próximos, enquanto que para amplitude e fase de 2F e amplitude de 3F as constantes de tempo em 12 Hz foram maiores que em 36 Hz.

Em geral, as constantes de tempo estimadas a partir das variações de fase foram maiores para $3F$ seguido por $2F$ seguido por F , o que parece concordar com a maior magnitude de aumento encontrada em $3F > 2F > F$. A influência da frequência temporal nas constantes de tempo estimadas para fase não foi sistemática. Para F e $3F$, as constantes de tempo estimada para fase do cone M foi maior do que as estimadas a partir do cone L. Para $2F$ e $3F$, as constantes de tempo estimadas das variações de fase do mecanismo cromático foram maiores do que as estimadas a partir de do mecanismo de luminância.

Tabela 3. Constante de tempo média (min) de amplitude e fase dos componentes F, 2F e 3F, durante a adaptação à luz para cada tipo de resposta eletrorretinográfica analisada.

Tipos de resposta	Componentes Harmônicos					
	F		2F		3F	
	Amplitude	Fase	Amplitude	Fase	Amplitude	Fase
Cone L-12 Hz	2,34	0,04	0,095	2,22	0,1	2,53
Cone L-36 Hz	4,24	1,89	0,59	4,04	2,08	-
Cone M-12 Hz	2,62	0,2	4,93	4,88	7,04	5,16
Cone M-36 Hz	5,72	11,31	0,99	2,11	5,66	-
Cromático-12 Hz	1,54	1,25	4,17	4,87	-	5,33
Cromático-36 Hz	-	0,2	4,58	2,86	7,6	-
Luminância-12 Hz	2,8	-	3,73	3,12	5,06	3,88
Luminância-36 Hz	3,04	3,36	3,1	2,08	2,07	4,17

- Condições com $\tau > 16$ min, ou seja, os dados não apresentaram uma variação linear durante a adaptação à luz.

4.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS CONSIDERANDO A CONTRIBUIÇÃO DAS VIAS MAGNOCELULAR (M) E PARVOCELULAR (P) NA ADAPTAÇÃO À LUZ

Com base em estudos anteriores consideramos que nossas condições de estimulação podem induzir a atividade da via magnocelular (M) e da via parvocelular (P) (KREMERS; LINK, 2008; KREMERS et al., 2010; KOMMANAPALLI et al., 2014, JACOB et al., 2015; MARTINS et al, 2016), considerando que o componente F de ERG cromático e de luminância à 12 Hz e ERG cromático à 36 Hz receberiam predominantemente a contribuição da via P para sua geração.

Além disso, observa-se que ERG conduzido por cone M e cone L à 12 Hz também apresentavam característica das vias de oponência de cor, uma vez que durante o período de adaptação fotópica, houve uma razão de amplitude L/M próxima a uma unidade (figura 35) e diferença de fase L-M próxima a 180° (figura 36) em 12 Hz. Considera-se, também, que o componente F do mecanismo de luminância à 36 Hz teria uma maior contribuição da atividade da via M, bem como as respostas eletrorretinográficas do cone M e do cone L à 36 Hz, na qual observa-se que durante o período de adaptação à luz, houve uma assimetria considerável da amplitude de F da resposta isolada de cone L e M, como é esperado para as células que não apresentam oponência de cor, como as da via M.

Os resultados referentes ao tempo de adaptação fotópica mostraram que as constantes de tempo estimadas de amplitude e fase para o componente F do ERG proveniente das condições atribuídas a via P (cone L 12 Hz, cone M 12 Hz, cromático 12 Hz, cromático 36 Hz e luminância 12 Hz, com média de 1,4 min, considerando amplitude e fase) foram menores do que aquelas proveniente das condições atribuídas a via M (luminância 36 Hz, cone L 36 Hz e cone M 36 Hz, com média de 4,9 min, considerando amplitude e fase) como mostrado na Figura 31. Já os dados de constante de tempo dos componentes 2F e 3F não seguem uma linearidade. Se a mesma análise for feita para esses componentes tem-se valores médios de τ , considerando amplitude e fase, menores, refletindo adaptação mais rápida, para as condições: luminância 36 Hz, cone L 36 Hz e cone M 36 Hz ($2F = 2,2$ e $3F = 3,8$ min) enquanto as condições: cone L 12 Hz, cone M 12 Hz, cromático 12 Hz, cromático 36 Hz e luminância 12 Hz apresentam τ médio de 3,5 e 4,6 min para 2F e 3F, respectivamente.

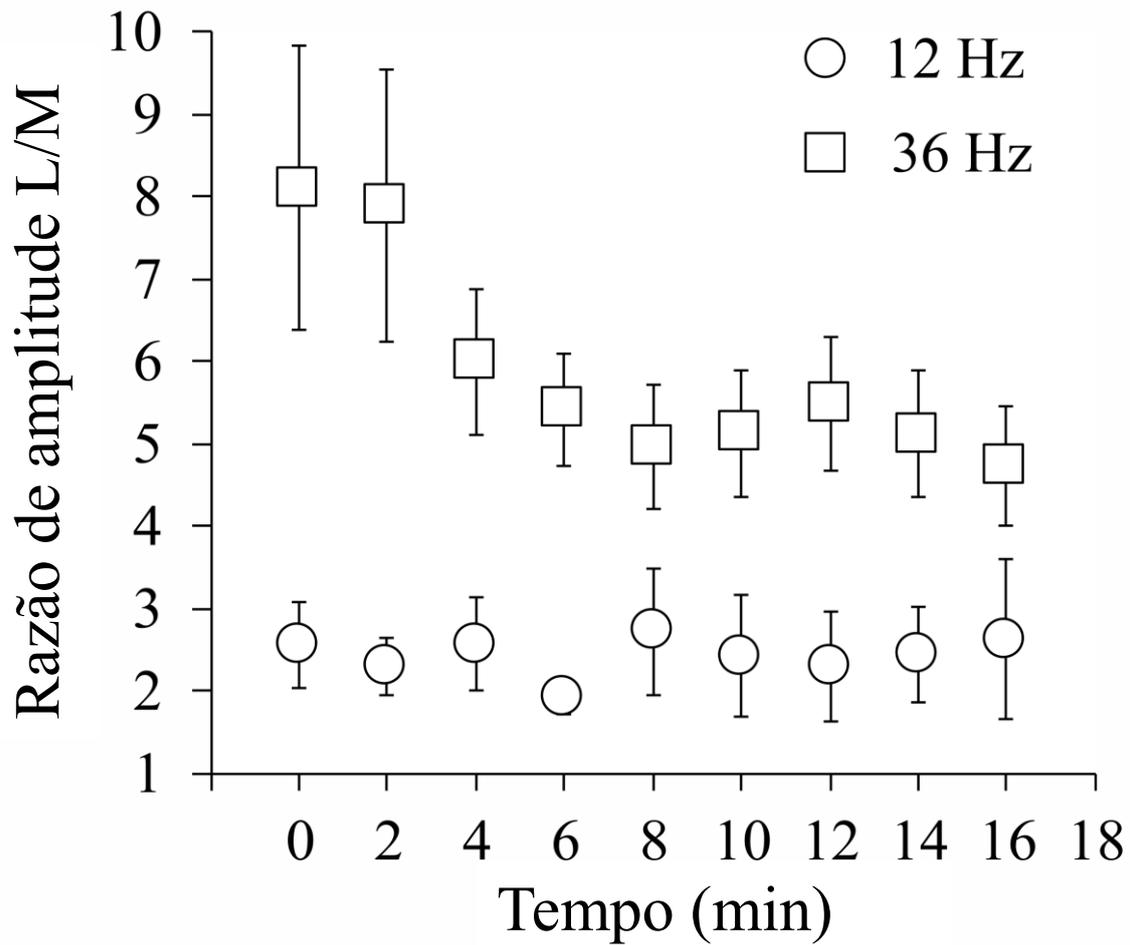


Figura 35. Razão de amplitude de cone L/M à 12 e 36 Hz durante a adaptação à luz. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. Em 12 Hz F apresentou razão próxima de uma unidade durante todo o período de adaptação, como esperado para as vias de otonência de cor (via P). O ERG à 36 Hz teve grande assimetria de amplitude entre as respostas de isolamento de cone L e M ao longo da adaptação à luz, como observadas para vias que não possuem otonência de cor (via M).

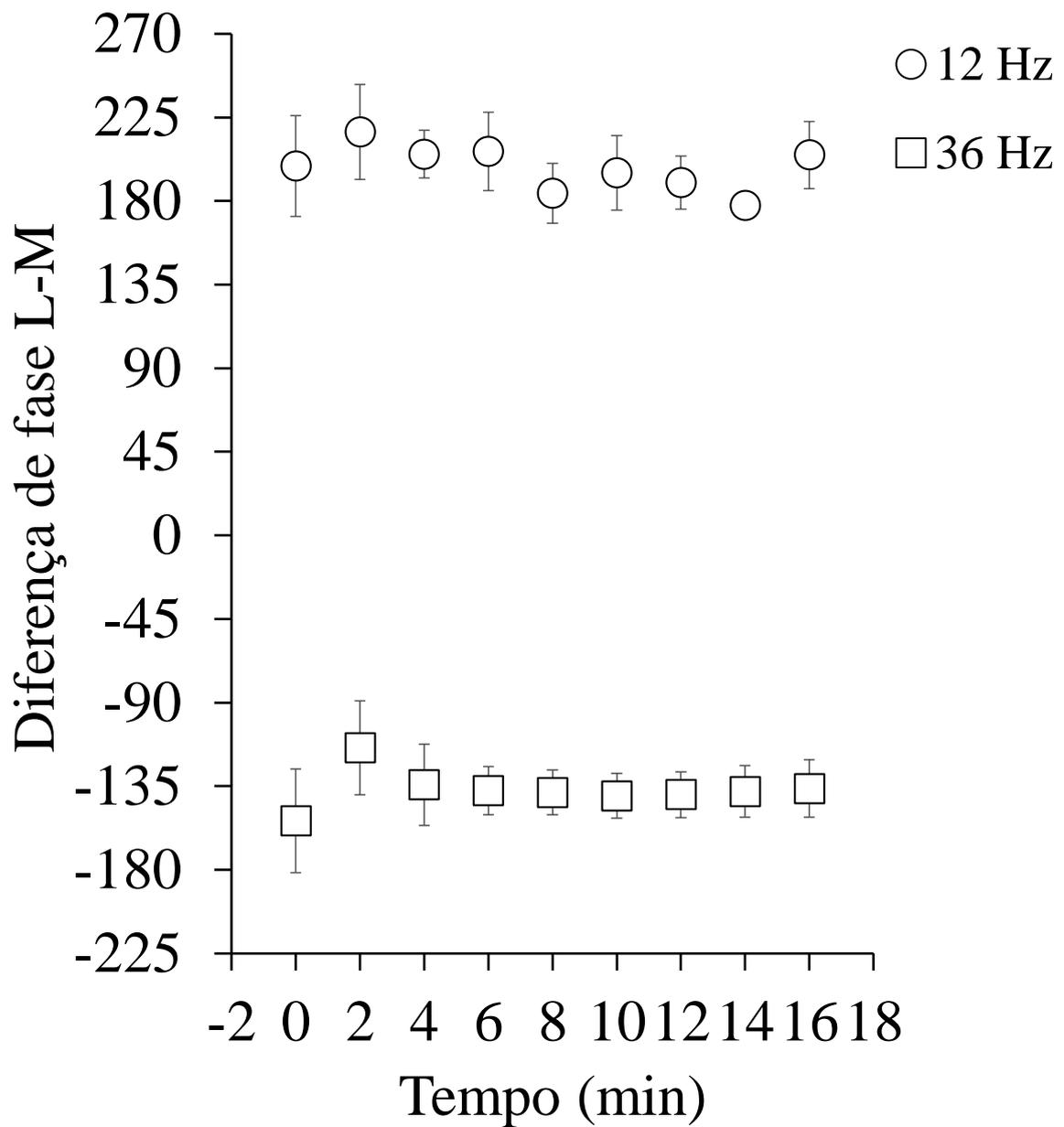


Figura 36. Diferença de fase de cone L-M à 12 e 36 Hz durante a adaptação à luz. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. Em 12 Hz, F apresentou diferença de fase entre cone L e M próximo a 180° , indicando que esses fotorreceptores estão operando de forma oponente, refletindo atividade da via P. Enquanto que em 36 Hz a diferença L-M foi próxima a 135° , ou seja, essa oponência de cor não foi observada, indicando atividade da via M.

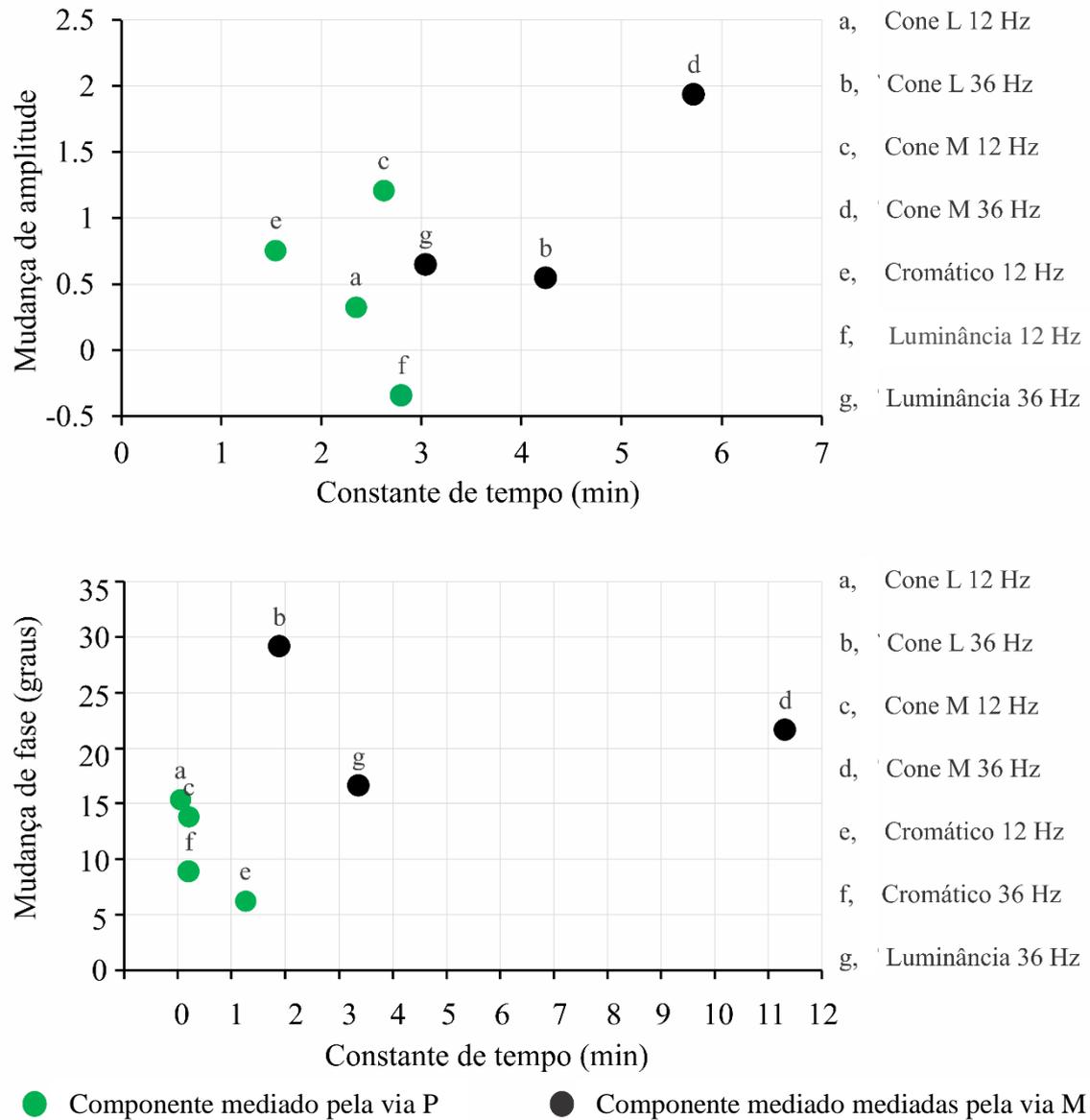


Figura 37. Variação de amplitude (gráfico superior) e fase (gráfico inferior) do primeiro harmônico (F) em função da constante de tempo de adaptação à luz. Os dados correspondem aos valores médios de a e τ estimados pela equação 2. Os símbolos coloridos em verde representam os componentes que provavelmente são mediados pela via pós receptorar parvocelular (via P), enquanto que os símbolos pretos correspondem as respostas que provavelmente são mediadas pela via pós receptorar magnocelular (via M). Os componentes atribuídos a via P apresentaram menores constantes de tempo que os atribuídos a via M. Ou seja, a adaptação à luz foi mais rápida nas respostas mediadas pela via P que pela via M.

5. DISCUSSÃO

A presente investigação teve como objetivo estimar a magnitude e cinética das variações de amplitude e fase durante a adaptação à luz após um período de adaptação ao escuro para mecanismos de isolamento das respostas conduzidas por fotorreceptores específicos (L e M) e vias pós receptorais retinianas específicas (M e P) através do eletrorretinograma de campo total (ffERG). Foram estudadas as respostas dos três primeiros harmônicos de 4 mecanismos de isolamento diferentes e observou-se que os diferentes componentes e tipos de resposta apresentaram diferentes magnitude e tempos de adaptação à luz, que podem ser explicados, pelo menos parcialmente, pelo mecanismo pós-receptor que refletem.

Este estudo amplia os dados já descritos na literatura de várias maneiras. Ao usar estímulos senoidais em torno de uma luminância e cromaticidade média, como utilizado por McAnany e Nolan (2014), em vez de *flash* ou sequência de *flashes*. Assim, foi possível gerar estímulos em que a frequência e o estado médio de adaptação podem ser alterados de forma independente. Isso possibilitou medir as respostas aos estímulos cromáticos e de luminância. Ao usar diferentes frequências temporais, os ERGs refletiram as respostas das vias pós-receptorais sensíveis à cromaticidade (via P) e à luminância (via M) (KREMERS; LINK, 2008; CHALLA et al., 2010; KREMERS et al., 2010; KREMERS; PANGENI, 2012; PARRY et al., 2012; KOMMANAPALLI et al., 2014; JACOB et al., 2015; MARTINS et al., 2016).

Além disso, os estímulos utilizados fornecem a possibilidade de isolar as respostas de um tipo de cone através da tripla substituição silenciosa. Consequentemente, foi possível medir ERGs conduzidos exclusivamente pelos cones L ou M. As respostas aos estímulos senoidais são dominadas pelos componentes primeiro, segundo e terceiro harmônicos. Ao extrair esses componentes através da análise de Fourier, foram descritas as principais mudanças nas respostas.

Amplitudes e fases dos componentes que apresentaram variação linear ($\tau < 16$ min) apresentaram aumento durante a adaptação à luz, com exceção da amplitude de F da condição de luminância à 12 Hz. A exceção encontrada na condição de luminância de 12 Hz também pode ser observada na forma de onda, como única resposta que não apresentou forma senoidal e constante ao longo do tempo (figura 24), reflexo de, também, ter sido a única resposta dominada pelo componente 2F em alguns tempos de registro (figura 26).

A diminuição na amplitude do primeiro harmônico e um aumento no segundo harmônico, resultando em uma resposta com frequência dobrada pode ser determinada pela presença de dois mecanismos que contribuem para a resposta ao *flicker* com estímulo de

luminância à 12 Hz no ERG. Foi proposto por estudos prévios que esse tipo de resposta é composta por um componente senoidal e um componente transiente que reflete a contribuição de dois mecanismos distintos (BURNS et al., 1992; ODOM et al., 1992; KONDO; SIEVING, 2001; VISWANATHAN et al., 2002; PANGENI et al. 2010). Esses estudos mostraram que o componente senoidal tinha uma amplitude mínima em 12 Hz, enquanto o componente transiente tinha uma amplitude máxima. O componente transiente teve propriedades semelhantes ao componente 2F do ERG de luminância à 12 Hz. Provavelmente em nossos resultados, as mudanças nas respostas F e 2F são dependentes da adaptação que ocorre nos diferentes mecanismos representados pelos componentes senoidal e transiente.

As respostas às modulações senoidais de luminância em alta frequência temporal (31,25 Hz) foram previamente estudadas por McAnany e Nolan (2014). Como no presente estudo, seus registros foram analisados por transformada rápida de Fourier para extrair estimativas de magnitude e constantes tempo das mudanças de amplitude e fase dos componentes F, 2F e 3F. Seus resultados são comparáveis, por semelhança metodológica, com a condição de luminância à 36 Hz utilizada no presente trabalho.

Corroborando com os dados de McAnany e Nolan (2014), os ERGs de luminância em alta frequência temporal mostraram maiores variações de amplitude e fase nos componentes 3F e as menores mudanças de amplitude e fase nos componentes 2F. Em termos absolutos, as constantes de tempo de amplitude de F e 3F foram semelhantes: McAnany e Nolan relataram constantes de tempo média de aproximadamente 3 e 1,4 minutos para F e 3F, respectivamente, que estão próximas dos 3,04 e 2,07 minutos encontrados no presente trabalho (ver tabela 3). Para 2F, ambas as investigações diferiram na constante de tempo estimada a partir dos dados de amplitude (McAnany e Nolan: 0,4 min; presente estudo: 3,1 min). Quanto a constante de tempo de fase McAnany e Nolan não encontraram variação em F, já 2F e 3F apresentaram $\tau = 2$ min enquanto no presente estudo as constantes de tempo de 2F e 3F diferiram ($\tau = 2,08$ e 4,17, respectivamente).

Para a amplitude de F, observou-se um crescimento de amplitude de 0,22 log na base 10 (tabela 2), enquanto McAnany e Nolan (2014) encontraram aumento de amplitude de 0,26 log na base. Para 2F, ambos estudos encontraram uma ligeira variação de amplitude em função da adaptação à luz (McAnany e Nolan: fator de 0,2 log na base 10; presente estudo: fator de 0,009 log na base 10). Para 3F, o crescimento de amplitude apresentou um fator de 0,35 log na base 10, enquanto McAnany e Nolan (2014) encontraram crescimento de amplitude de 0,7 log na base 10.

As mudanças na resposta de fase não foram tão semelhantes nos dois estudos. McAnany e Nolan encontraram que não houve variação em F e aumento de cerca de 45 graus para os componentes 2F e 3 F. No presente estudo, F, 2F e 3F apresentaram alterações de fase de 16,6, 63,6 e 106,6 graus, respectivamente. Enquanto para McAnany e Nolan (2014), os resultados para a variação de fase sugerem mecanismo similar de adaptação fotópica para 2F e 3F, nosso dado de fase suporta a diferença de mecanismos de adaptação de luz entre os diferentes harmônicos.

As poucas diferenças observadas nos presentes resultados em comparação com McAnany e Nolan (2014), especialmente nas mudanças de fase, devem ser principalmente devido a diferenças na luminância média do campo de adaptação (McAnany e Nolan: 50 cd/m²; presente estudo: 284 cd/m²) e o contraste de luminância (McAnany e Nolan: 100%, presente estudo: 75%). A diferença de frequência temporal de estimulação (31,25 Hz versus 36 Hz) deve ter pouca influência para explicar as diferenças entre ambos os estudos. Peachey et al. (1992) investigaram o ERG a 31,1 Hz para diferentes luminância do campo de adaptação variando de -1,2 a 2,1 log cd/m² e observaram que com o aumento da luminância do campo de adaptação, a constante de tempo também aumentou. Nossos resultados obtidos usando o campo de adaptação de alta luminância de 2F e 3F estimaram o tempo de adaptação mais longo em comparação com os resultados de McAnany e Nolan (2014) com campo de adaptação de baixa luminância. Observou-se que no presente estudo, com menor contraste de luminância, o tempo de adaptação foi mais longo para 2F e 3F comparado com os resultados de McAnany e Nolan (2014), com maior contraste de luminância.

A maior magnitude de aumento de amplitude de F em respostas conduzidas por cone M comparadas com as conduzidas por cone L, pode representar uma maior contribuição do cone M no ganho de amplitude das respostas eletrorretinográficas não isoladas durante a adaptação à luz observado em estudos prévios. Como o cone S está em baixa proporção na retina a análise da sua participação assim como da sua via koniocelular no fenômeno de adaptação à luz não foi viável por resultar em respostas muito baixas dificilmente diferenciadas do ruído.

Diversos estudos indicam que bastonetes adaptados ao escuro inibem a ativação do sistema de cones e essa inibição é gradualmente suprimida ao longo da adaptação fotópica. Além disso, a influência dos bastonetes sobre os cones pode refletir diferencialmente nos diferentes mecanismos pós receptorais (CAO et al., 2006). Há duas vias de *input* de bastonetes para células ganglionares (WASSELL; BOYCOTT, 1991; GRUNERT; WASSLE, 1996). Uma via consiste num circuito em que os bastonetes fazem sinapses com células bipolares de bastonetes cuja informação é transmitida para células amácrinas (AII). As células amácrinas

transmitem informação para células bipolares de cones que, por sua vez, transmitem o sinal de bastonetes para as células ganglionares (figura 12). Outra via é baseada no acoplamento elétrico (junções comunicantes) entre cone e bastonete e o resultado dessa interação é conduzido pelas células bipolares de cones e suas respectivas vias (SCHNEEWEISS; SCHNAPF, 1995).

Existe uma variedade de forças de *input* de bastonete para as diferentes células ganglionares. Sendo que as células ganglionares M recebem um *input* substancial de bastonetes enquanto as células ganglionares P recebem fraco *input* de bastonetes (LEE et al., 1997; CAO et al., 2006; CAO et al., 2010).

A hipótese de inibição de bastonetes sobre a atividade dos cones durante a adaptação à luz é fundamentada pelo eletrorretinograma multifocal (mfERG) durante a adaptação à luz. A amplitude do ERG na periferia da retina teve maiores mudanças durante o período de adaptação à luz, enquanto o ERG foveal teve poucas mudanças de amplitude no mesmo período (KONDO et al., 1999). O presente experimento descreveu como o ERG conduzido pelos sistemas de cone L e M, cromático e luminância mudam durante a adaptação à luz. Considerando que foi relatado que cada sistema reflete a atividade retiniana pós-receptoral da via de oposição cromática verde-vermelho, parvocelular (via P) e da via de oposição de luminância, magnocelular (via M) (KREMERS; LINK, 2008), nós hipotetizamos que cada sistema recebe diferente força de informação das interações cone-bastonete e as diferenças de constante de tempo para as várias condições de estimulação podem ser explicadas pelos *inputs* de bastonetes para esses sistemas.

O primeiro harmônico, componente que domina as respostas, apresentando maior energia, apresentou resultados mais claros que os demais componentes. Logo, F foi considerado para análise da participação das vias paralelas no fenômeno de adaptação fotópica. As respostas foram, então, separadas em as que refletem a atividade da via P: cone M à 12 Hz, cone L à 12 Hz, estímulo cromático à 12 e 36 Hz, estímulo de luminância à 12 Hz, e as respostas ao ERG que refletem a atividade da via M: cone M à 36 Hz, cone L à 36 Hz e estímulos de luminância à 36 Hz. A adaptação à luz foi mais rápida e de menor magnitude para amplitude e fase de ERG nas condições que ativaram preferencialmente a via P do que nas que ativaram preferencialmente a via M. Uma vez que a via M recebe mais *input* de bastonete do que a via P, sugere-se que a adaptação mediada por este canal seria de maior magnitude e duraria mais tempo para se adaptar à luz do que o ERG mediado pela via P.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo descreveu detalhadamente, pela primeira vez, a magnitude e cinética de variação de amplitude e fase dos componentes primeiro, segundo e terceiro harmônico da resposta ao eletrorretinograma de campo total para respostas isoladas de cone L, cone M mecanismo de luminância e cromático vermelho-verde em duas frequências temporais de estimulação, 12 e 36 Hz, que refletem a atividade das vias paralelas parvocelular e magnocelular, respectivamente. Analisando o primeiro harmônico pôde-se verificar que as respostas atribuídas a via P apresentaram adaptação mais rápida que as conduzidas pela via M, mostrando que as diferentes vias possuem diferentes mecanismos de adaptação à luz. A característica de maior magnitude de aumento de amplitude e fase assim como a adaptação mais lenta da via M pode reforçar a hipótese de supressão da inibição dos bastonetes sobre os cones ao longo do tempo de adaptação à luz, uma vez que essa via recebe maior influência da atividade dos bastonetes. São necessários mais estudos para auxiliar na compreensão do fenômeno de adaptação à luz, assim como dos mecanismos celulares envolvidos nesse processo.

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Os resultados provenientes do presente estudo foram apresentados em forma de pôster intitulado “**The light adaptation phenomenon in human: receptor and post-receptor involvement**” em congresso internacional, reunião anual da ARVO 2016 (Association for Research in Vision and Ophthalmology)”, realizada de 1 a 5 de maio de 2016, Seattle, WA, Estados Unidos. O resumo publicado nos anais do evento encontra-se no anexo 1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, K. R.; RAGHURAM, A.; RAJAGOPALAN, A. S. Cone phototransduction and growth of the erg b-wave during light adaptation. **Vis Res**, v. 46, p. 3941–3948, 2006.

ANDERSON, D. H.; FISHER S. K. The photoreceptors of diurnal squirrels: outer segment structure, disc shedding, and protein renewal. **J Ultrastruct Res**, v. 55, n.1, p. 119–41, 1976.

ARDEN, G. B.; FRUMKES, T. E. Stimulation of rods can increase cone flicker ERGs in man. **Vision Res**, v. 26, p. 711–721, 1986.

ARMINGTON, J.C.; BIERSDORF, W. R. Long-term light adaptation of the human electroretinogram. **J Comp Physiol Psychol**, v. 51, p. 1–5, 1958.

AWATRAMANI, G. B.; SLAUGHTER, M. M. Origin of transient and sustained responses in ganglion cells of the retina. **Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 7087-7095, 2000.

BARRY, B. B.; SUN, H. The chromatic input to cells of the magnocellular pathway of primates. **J Vis**. v. 9, n. 2, p. 15.1–1518.

BENOIT, J.; LACHAPELLE, P. Light adaptation of the human photopic oscillatory potentials: influence of the length of the dark adaptation period. **Doc Ophthalmol**, v. 89, p. 267–276, 1995.

BERNTSON, A.; TAYLOR, W.R. Response characteristics and receptive field widths of on-bipolar cells in the mouse retina. **Journal of Physiology**, v. 524, n. 3, p. 879-889, 2000.

BOYCOTT, B. B.; WÄSSLE, H. Morphological classification of bipolar cells in the macaque monkey retina. **European Journal Neuroscience**, v. 3, p. 1069-1088, 1991.

BRASIL, A. et al. Diet enriched with the Amazon fruit açai (Euterpe oleracea) prevents electrophysiological deficits and oxidative stress induced by methyl-mercury in the rat retina. **Nutr Neurosci**. v. 20, n. 5, p. 265-272, 2016.

BURNS, S. A.; ELSNER, A. E.; KREITZ, M. R. Analysis of nonlinearities in the flicker ERG. **Optom Vis Sci**, v. 69, n. 2, p. 95–105, 1992.

BURNS, M. E. et al. Dynamics of Cyclic GMP Synthesis in Retinal Rods. **Neuron**, v. 36, p. 81-91, 2002.

CALKINS, D. J. Seeing with S cones. **Prog. Retin. Eye Res**. v. 20, n.3, p. 255–287, 2001.

CALLAWAY, E. M. Structure and function of parallel pathways in the primate early visual system. **The Journal of Physiology**. v. 566, n. 1, p. 13-19, 2005.

CAMERON, M. A.; LUCAS, R. J. Influence of the rod photoresponse on light adaptation and circadian rhythmicity in the cone ERG. **Molecular Vision**, v. 15, p. 2209-2216, 2009.

CHALLA, N. K. et al. L- and M-cone input to 12Hz and 30Hz flicker ERGs across the human retina. **Ophthalmic and Physiological Optics**. v. 30, p. 503-510, 2010.

DACEY, D. M.; LEE, B. B. The 'blue-on' opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. **Nature**. v. 367, n. 6465, p. 731-735, 1994.

DACEY, D. M. Primate retina: cell types, circuits and color opponency. **Prog Retin Eye Res**, v. 18, n. 6, p. 737-763, 1999.

DACEY, D.M. Parallel pathways for spectral coding in primate retina. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 23, p. 743-775, 2000.

DEVRIES, S. H.; BAYLOR, D. A. An alternative pathway for signal flow from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** **92**, v. 7, n. 92, p. 10658-10662, 1995.

DOS REIS, J. W.; DE CARVALHO, W. A; SAITO, C. A, SILVEIRA, L. C. Morphology of horizontal cells in the retina of the capuchin monkey, *Cebus apella*: how many horizontal cell classes are found in dichromatic primates? **J Comp Neurol**. v. 443, n. 2, p. 105-123, 2002.

DOWLING, J. E.; RIPPS, H. S-potentials in the skate retina. Intracellular recordings during light and dark adaptation. **Journal of General Physiology**, v. 58, p. 163-189, 1971.

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

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

EULER, T.; SCHNEIDER, H.; WÄSSLE, H. Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. **Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 2934-2944, 1996.

FU, Y.; YAU, K. W. Phototransduction in mouse rods and cones. **Pflugers Archive European Journal Physiology**, v. 454, p. 805-819, 2007.

GEGENFURTNER, K.R.; KIPER, D.C. Color Vision. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 26, p.181-206, 2003.

GERMAIN, F. et al. Functional histology of the retina. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.)** p. 914-925, 2010.

GOURAS, P.; MACKAY, C. J. Growth in amplitude of the human cone electroretinogram with light adaptation. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 30, p. 625-630, 1989.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Tradução da 12^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HECKENLIVELY, J. R.; ARDEN, G.B. **Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision**. 2^a ed. Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology, 2006.

HOFER, H. et al. Organization of the human trichromatic cone mosaic. **J Neurosci**. v. 25, n. 42, p. 9669-9679, 2005.

JACOB, M. M. et al. Eletrorretinograma de campo total: das origens celulares à aplicação clínica. **Neurociências**. v. 7, n. 2, 107-117, 2011.

JACOB, M. M. et al. The spatial properties of L- and M-cone inputs to electroretinograms that reflect different types of post-receptor processing. **PLoS One**. v. 10, n. 3, e0121218, 2015.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of neural science**. 4a ed. New York: MacGraw-Hill, 2000.

KOLB, H. How the Retina Works. **American Scientist**, v. 91, p. 28-35, 2003.

KOMMANAPALLI, D. et al. Temporal characteristics of L- and M-cone isolating steady-state electroretinograms. **J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis**, v. 31, p. 113–120, 2014.

KONDO, M. et al. Amplitude increase of the multifocal electroretinogram during light adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 40, 2633-2637, 1999.

KONDO, M.; SIEVING, P. A. Primate photopic sine-wave flicker ERG: Vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n. 1, p. 305–312, 2001.

KREMERS, J. et al. L/M cone ratios in human trichromats assessed by psychophysics, electroretinography, and retinal densitometry. **J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis**. v. 17, n. 3, p. 517-526, 2000.

KREMERS, J. The assessment of L- and M-cone specific electroretinographical signals in the normal and abnormal retina. **Prog Retin Eye Res**, v. 22, p. 579–605, 2003.

KREMERS, J.; LINK, B. Electroretinographic responses that may reflect activity of parvo- and magnocellular post-receptor visual pathways. **J Vis**, v. 8, p. 1–14, 2008.

KREMERS, J. et al. Flicker ERGs Representing Chromaticity and Luminance Signals. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 51, p. 577–587, 2010.

KREMERS, J.; PANGENI, G. Electroretinographic responses to photoreceptor specific sine wave modulation. **Journal of the Optical Society of America**, v. 29, p. A309–A316, 2012.

KREMERS, J. et al. Incremental and decremental L- and M-cone driven ERG responses: II. Sawtooth stimulation. **J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis**, v. 31, p. A170–178, 2014.

- LAMB, T. D.; PUGH, JR, E. N. A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors. **Journal of Physiology**, London, v. 449, p.719-58, 1992.
- LEE, B. B. et al. Horizontal cells reveal cone type-specific adaptation in primate retina. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 25, p. 14611–14616, 1999.
- LEE, B. B.; MARTIN, P. R.; GRÜNERT, U. Retinal connectivity and primate vision. **Prog Retin Eye Res**,. v. 29, n. 6, p. 622-639, 2010.
- LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios?** Conceitos Fundamentais de Neurociências. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- MARMOR, M. F. et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). **Doc Ophthalmol**, v. 118, p. 69-77, 2009.
- MARTINS, C.M. et al. The influence of stimulus size on heterochromatic modulation electroretinograms. **J Vis.**, v. 16, n. 8, p. 1-11, 2016.
- MASLAND, R.H. The fundamental plan of the retina. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 9, p. 877-886, 2001.
- MATTHEWS, H. R. et al. Photoreceptor light adaptation is mediated by cytoplasmic calcium concentration. **Nature**. v. 334, p. 67–69, 1988.
- MCANANY, J. J.; NOLAN, P. R. Changes in the harmonic components of the flicker electroretinogram during light adaptation. **Doc Ophthalmol**. v. 129, n. 1, p. 1-8, 2014.
- MCCULLOCH, D.L. et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). **Doc Ophthalmol.**, v. 130, n. 1, p. 1-12, 2015.
- MCKEEFRY, D. 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**. v. 31, p. A159–169, 2014.
- MEIGEN, T.; BACH, M. On the statistical significance of electrophysiological steady-state responses. **Doc Ophthalmol**. v. 98, n. 3, p. 207-232, 1999.
- MILLER, S., SANDBERG, M. A. Cone electroretinographic change during light adaptation in retinitis pigmentosa. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 32, p. 2536–2541, 1991.
- MIYAKE, Y.; HORIGUCHI, M. O. T. A. I, SHIROYAMA, N. Characteristic erg-flicker anomaly in incomplete congenital stationary night blindness. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 28:1816–1823, 1987.

MURAYAMA, K.; SIEVING, P. A. Different rates of growth of monkey and human photopic a-, b-, and d-waves suggest two sites of erg light adaptation. **Clin Vis Sci**, v. 7, p. 385–392, 1992.

NASSAU, K. **The physics and chemistry of color: the fifteen causes of color**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

NASSI, J. J.; CALLAWAY, E. M. Parallel processing strategies of the primate visual system. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 10, p. 360-372, 2009.

NOELL, W.K. The origin of the eletroretinogram. **Am J Ophthalmol**, v. 38, p. 78-90, 1954.

NORMANN, R.A.; PERLMAN, I. The effects of background illumination on the photoresponses of red and green cones. **J Physiol**, v. 286, p. 491–507, 1979.

ODOM, J. V. et al. Flicker electroretinograms: A systems analytic approach. **Optom Vis Sci**. v. 69, n. 2, p. 106–116, 1992.

PAIK, S. S. et al. Anthocyanins from the seed coat of black soybean reduce retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea. **Experimental Eye Research**, v. 97, n. 1, p. 55-62, 2012.

PANGENI, G.; HORN, F. K.; KREMERS, J. A new interpretation of components in the ERG signals to sine wave luminance stimuli at different temporal frequencies and contrasts. **Vis Neurosci**, v. 27, n. 3-4, p. 79-90, 2010.

PARRY, N. R. et al. Simultaneous Chromatic and Luminance Human Electroretinogram Responses. **J Physiol**, v. 590, p. 3141–3154, 2012.

PEACHEY, N.S. et al. Properties of the human cone system electroretinogram during light adaptation. **Appl Opt**, v. 28, p. 1145–1150, 1989.

PEACHEY, N. S.; ALEXANDER, K. R.; FISHMAN, G. A. Visual adaptation and the cone flicker electroretinogram. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 32, n. 5, p. 1517-1522, 1991.

PEACHEY, N.S. et al. Light adaptation, rods, and the human cone flicker ERG. **Vis Neurosci**, v. 8, p. 145–150, 1992.

PETRASH, J. M. Aging and Age-Related Diseases of the Ocular Lens and Vitreous Body. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 14, p. ORSF54–ORSF59, 2013.

PUGH, E. N. JR.; COBBS, W. H. Visual transduction in vertebrate rods and cones: a tale of two transmitters, calcium and cyclic GMP. **Vision Res**. v. 26, n. 10, p. 1613-43, 1986.

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

RAVIOLA, E.; DACHEUX, R. F. Excitatory dyad synapse in rabbit retina. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 7324–7328, 1987.

- ROORDA, A.; WILLIAMS, D. R. The arrangement of the three cone classes in the living human eye. **Nature**, v. 397, n. 6719, p. 520-522, 1999.
- SHAPIRO, A. G.; POKORNY, J.; SMITH, V. C. Cone-rod receptor spaces with illustrations that use the CRT phosphor and light-emitting-diode spectra. **Journal of the Optical Society of America A**. v. 13, p. 2319–2328, 1996.
- SQUIRE, L. R.; BLOOM, F. E.; SPITZER, N. C. **Fundamental Neuroscience**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. 301 p.
- TAKEUCHI, T.; DE VALOIS, K. K. Velocity discrimination in scotopic vision. **Vision Res.** v. 40, n. 15, p. 2011-2024, 2000.
- VINCENT, A.; ROBSON, A. G.; HOLDER, G. E. Pathognomonic (diagnostic) ERGs. A review and update. **Retina**, v. 33, n. 1, p. 5-12, 2013.
- VISWANATHAN, S.; FRISHMAN, L. J.; ROBSON, J. G. Inner-retinal contributions to the photopic sinusoidal flicker electroretinogram of macaques. **Doc Ophthalmol.** v. 105, n. 2, p. 223–242, 2002.
- WANG, J. S.; KEFALOV, V. J. The cone-specific visual cycle. **Prog Retin Eye Res.** v. 30, n. 2, p. 115-128, 2011.
- WÄSSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina. **Nature Review Neuroscience**. v.5, p. 747-757, 2004.
- WOLPERT, K.; TSANG, S. Electroretinography. In: BELUSIC D. **Electroretinograms**. Rijeka, Croatia; In Tech, 2011.
- ZELE, A. J.; CAO, D. Vision under mesopic and scotopic illumination. **Front. Psychol**, v. 5, n. 1594, p. 1-15, 2014.

ANEXO 1: RESUMO DO TRABALHO “THE LIGHT ADAPTATION PHENOMENON IN HUMAN: RECEPTORAL AND POST-RECEPTORAL INVOLVEMENT” PUBLICADO NOS ANAIS DO EVENTO “REUNIÃO ANUAL DA ARVO 2016 (ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY)” REALIZADO DE 1 A 5 DE MAIO DE 2016, SEATTLE, WA, ESTADOS UNIDOS.

ARVO 2016 Annual Meeting Abstracts

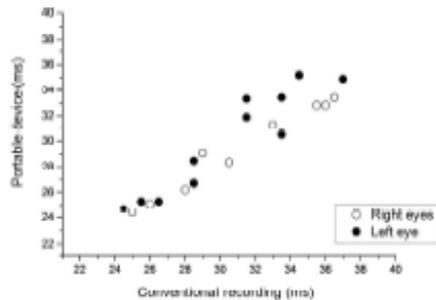


Figure 1. 30 Hz ERG implicit times in patients.

Commercial Relationships: Omar A. Mahroo, None; Angharad E. Hobby, None; Ekaterina H. Yonova, None; Diana Kozareva, None; Ibtesham T. Hossain, None; Mohamed Katta, None; Christopher J. Hammond, None; Miles R. Stanford, None

Support: Fight for Sight UK (Grant 1409/10); Fight for Sight UK & Birdshot Uveitis Society (24BU141)

Program Number: 3595 **Poster Board Number:** B0035

Presentation Time: 11:00 AM–12:45 PM

Super-normal flicker ERG amplitudes in eyes with non-ischemic CRVO

Ryohsei Miyata¹, Kumiko Kato², Yoshitsugu Matsui¹, Maki Kozawa¹, Hisashi Matsubara², Masahiko Sugimoto², Mineo Kondo².

¹Ophthalmology, Okanami General Hospital, Iga, Japan; ²Ophthalmology, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Japan.

Purpose: It is known that the implicit time of flicker ERGs is useful way to evaluate the degree of ischemia in eyes with central retinal vein occlusion (CRVO). During our study of flicker ERGs in eyes with CRVO, we noted that the amplitudes of the flicker ERGs in eyes with CRVO had “super-normal” flicker ERG amplitudes. The purpose of this study was to determine the clinical characteristics of CRVO patients associated with “super-normal” flicker ERG amplitudes.

Methods: Twenty-two eyes from 22 patients with CRVO (13 men, 9 women; mean age, 71.0 years), who visited our hospital within two years of the onset of the CRVO and underwent flicker ERG recordings from both eyes, were studied. After full mydriasis, the flicker ERGs were recorded with REteval, a small, hand-held ERG recording system using skin electrodes. The amplitudes and implicit times of the fundamental component were analyzed. “Super-normal” flicker ERGs were defined as those whose amplitudes were larger than 110% of that in the unaffected eye.

Results: Of all 22 eyes, there were 15 non-ischemic CRVO and 7 ischemic CRVO. Seven eyes (32%) had “super-normal” flicker ERG amplitude, and all of these eyes were those with non-ischemic CRVO.

The ratio of the amplitudes of the affected eye to the unaffected eye was $136 \pm 19\%$ in the “super-normal” group, and $88 \pm 33\%$ in the other eyes. The difference of the implicit times between the affected eye and unaffected eye was 2.2 ± 1.2 ms in the “super-normal” group and was significantly shorter than in the other eyes (5.1 ± 2.6 ms).

Conclusions: We found that about 30% of the eyes with CRVO had “super-normal” flicker ERG amplitude. “Super-normal” flicker ERGs

were mainly observed in eyes with mild non-ischemic CRVO. This phenomenon may be a sign of good prognosis for eyes with a CRVO. **Commercial Relationships:** Ryohsei Miyata, None; Kumiko Kato, None; Yoshitsugu Matsui, None; Maki Kozawa, None; Hisashi Matsubara, None; Masahiko Sugimoto, None; Mineo Kondo

Program Number: 3596 **Poster Board Number:** B0036

Presentation Time: 11:00 AM–12:45 PM

The light adaptation phenomenon in human: receptoral and post-receptoral involvement

Alodia Brasil^{1,2}, Tina I. Tsai¹, Givago S. Souza^{3,4},

Anderson M. Herculano⁵, Dora F. Ventura⁶, Luiz Carlos L. Silveira^{6,7}, Jan J. Kremers^{1,4}. ¹Ophthalmology, Friedrich-Alexander-Universität-Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany; ²Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil; ³Experimental Psychology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴Anatomy II, Friedrich-Alexander-Universität-Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany; ⁵Biological Sciences Institute, Federal University of Pará, Belém, Brazil; ⁶Cesuma University, Sao Luis, Brazil.

Purpose: The amplitudes of full-field flash and flicker electroretinograms (ERG) were found to increase over several minutes during light adaptation (LA) after an extended period in the dark. The aim of this study was to elucidate the involvement of the M- and L-cone photoreceptor streams and their respective post-receptoral pathways during LA using the flicker ERG.

Methods: Six healthy subjects (2 male and 4 female, 26–35 years old) with normal trichromatic color vision participated in the study. Four ERG protocols were presented to isolate individually, contributions of: L-cone-driven, M-cone-driven, luminance-driven (LUM), and chromaticity-driven (CHROM) channels at 12 and 36 Hz. All subjects underwent 30 min of dark adaptation before each protocol. Then the adapting light (284 cd/m^2) was switched on. Sinusoidal flicker modulation around the adapting field was presented every 2 min from time 0 to time 16 min after light onset. Amplitudes and phases of the fundamental component were obtained from Fourier analysis of all responses. LA-response profiles were fit with an inverse exponential function for each subject to obtain estimates of the semi-saturation time constant (τ) and total amplitude and phase change (Δ).

Results: Most amplitudes and phases changed during LA (except for CHROM 36 Hz amplitude, phase, and CHROM 12 Hz phase). Specifically, they increased as a function of LA (positive Δ). Only with the LUM 12 Hz condition was a negative Δ found. Estimates of τ could be grouped into two categories: one that exhibited shorter τ of approx. 2 min on average (L-cone, M-cone, CHROM 12 Hz, amplitude range 1–4 min, phase 1–2 min), and the other that had a longer τ of 4 min (L-cone, M-cone, LUM 36 Hz, amplitude 3–5 min, phase 2–4). For 12 Hz data, amplitudes and phases exhibited similar time constants for the different isolating conditions. L- and M-cone behaviors with increasing LA time had similar τ at 12 Hz. This was also the case at 36 Hz.

Conclusions: That L-cone and M-cone-driven responses exhibit similar behaviors during LA suggests that the LA-induced changes are likely a post-receptoral phenomenon. LA processes driven by activity in the magnocellular-based luminance (reflected by LUM, L- and M-cone at 36 Hz) and parvocellular-based chromaticity channels (CHROM, L- and M-cone at 12 Hz) show distinct response dynamics (τ of 4 and 2 min, respectively).

Commercial Relationships: Alodia Brasil, None; Tina I. Tsai, None; Givago S. Souza, None; Anderson M. Herculano, None; Dora F. Ventura, None; Luiz Carlos L. Silveira, None; Jan J. Kremers, None