

Isabel Alexandra de Sousa Pires

# CONTRIBUIÇÕES PARA A AVALIAÇÃO CLÍNICA DO EDEMA MACULAR DIABÉTICO

Tese de Doutoramento para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo Medicina, especialidade de Cirurgia/Oftalmologia, sob a orientação da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Lobo da Fonseca, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Coimbra, 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



**Isabel Alexandra de Sousa Pires**

# **Contribuições para a Avaliação Clínica do Edema Macular Diabético**

Tese de Doutoramento para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde,  
ramo Medicina, especialidade de Cirurgia/Oftalmologia, sob a orientação da  
Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Lobo da Fonseca, apresentada à  
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Coimbra, 2014



Este trabalho foi realizado na AIBILI – Associação para a Investigação Biomédica e Inovação em Luz e Imagem e no Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia (CRIO) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), sob a supervisão científica da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Lobo da Fonseca.



## **AGRADECIMENTOS**

As minhas primeiras palavras serão talvez as mais importantes desta tese, os agradecimentos.

Não teria sido possível caminhar sozinha, e nem tão pouco teria tido qualquer sabor...

Em 1998, quando entrei para a especialidade de oftalmologia, já sabia que o meu futuro diretor, Professor Doutor José Cunha-Vaz, era uma pessoa de enorme dinamismo e mérito científico, e que dirigia um serviço a crescer e que se pretendia afirmar pela qualidade e diferenciação dos seus elementos. Era também sobejamente conhecida a sua dedicação à retinopatia diabética, para a qual dera importantes contributos científicos, e o seu sonho de vida, criar um centro de ensaios clínicos e uma rede de investigação europeia. O que a mim me surpreendeu foi o convite que me dirigiu para integrar a sua equipa de investigação, e que mudou e marcou o meu percurso profissional e pessoal. Tive sorte! O Professor Doutor José Cunha-Vaz tem sido meu mestre, está sempre disponível, ajuda-me em tudo e tem sido meu amigo. Faz-me querer ser e fazer sempre melhor. Fico contente por poder agradecer-lhe de forma escrita e pública. Obrigada, Professor Cunha-Vaz!

Nesta equipa em que orgulhosamente me integrei, conheci melhor a Conceição Lobo. Com enorme sensibilidade e bom senso, a Conceição ajudou-me a contornar e ultrapassar todos os obstáculos que foram surgindo. Alegre, perspicaz e sabedora soube sempre orientar-me no caminho a seguir, e esteve sempre em minha defesa e meu auxílio. Obrigada, Conceição.

O Professor Doutor Joaquim Murta incentivou-me a concretizar este trabalho, sem complicações. Posso agora confirmar as suas palavras, 16 anos depois, “sim, escolheste bem”.

O Professor Doutor Rufino Silva é uma fonte de conhecimentos, sempre atuais, e um estímulo para nunca parar, fazendo o que gosto.

A Luisinha Ribeiro, companheira, tem sempre uma palavra doce, e com muita serenidade vamos levando a água ao moinho. Que bom tem sido “Comer E Conversar” (CEC) contigo.

Os elementos do serviço de oftalmologia do CHUC, um serviço grande, onde se incluem membros administrativos, auxiliares, enfermeiros, contribuem de forma muito importante para o meu trabalho. Do caos se faz luz, todos os dias.

A Enfermeira Chefe do serviço de oftalmologia, Fátima Canais, dirigiu-me sábias palavras, que me incentivaram e não esqueço.

Os meus colegas de Retina Médica, a Maria da Luz Cachulo, o João Figueira e o Pedro Fonseca são uma fonte de ajuda e inspiração, alegam e tornam mais leves os meus dias.

Os internos da especialidade de oftalmologia, irreverentes, são um elixir da juventude. O João Pedro Marques tem sido uma ótima surpresa e um amigo.

Para a Andreia uma palavra especial. Amiga e doce que não conheço igual, é uma amiga sempre presente, porque assim é. A Ju perspicaz, tolerante, ajudou-me a ver para além da medicina. Do meu “núcleo duro”, para além da Andreia, há a Joana, a Sofia e a Rosa, giras, modernas, bem-sucedidas, longe mas perto, para a vida. A Margarida e a Cati, a quem uns “caracóis” em tempos me uniram, atentas, divertidas, por mim, para sempre. Os Cavadas alegraram a nossa vida, com muito boa “onda”.

Por fim, a minha família.

Começo pelos meus avós, Antonieta e Virgílio, exemplos de integridade e longevidade, orgulhosos da neta. Onde estão, espero que me continuem a acompanhar.

Os meus pais são a minha âncora, seguram-me em tudo, sempre orgulhosos do que faço. Desde cedo que me mostraram o caminho, que depois percorri livremente.

A minha irmã Ana é uma baforada de energia e alegria, e nem preciso pedir... O meu irmão Zé é rigoroso e muito amigo, pela família. Com o Fernando sei que posso contar. Com a Mila percorro léguas “virtuais”.

A Sofia e o Zé Miguel para “banhos”. A Claudinha e o Alfredo amigos, atentos.

O meu sogro, avô Zé, amigo, muito disponível, sei que está atento e, do seu “lado”, continua a olhar por nós. A avó Céu corajosa, destemida, está sempre pronta, com um sorriso.

O meu marido Ruca soube compreender o meu percurso e torná-lo mais fácil. Reconheço que não teria conseguido...



Os meus filhos, Maria e Manuel, são a minha alegria e a minha luz.

O Ruca, a Maria e o Manuel foram a minha inspiração e a minha força.



Ao Professor Doutor José Cunha-Vaz  
À Professora Doutora Conceição Lobo



Aos meus pais  
Ao Ruca, Maria e Manuel, que caminham ao meu lado, sempre.



## RESUMO

A diabetes é um grave problema de saúde pública, que afeta progressivamente mais pessoas em todo o mundo, estimando-se que, em 2035, o número de diabéticos possa atingir os 592 milhões.

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação frequente da diabetes e, atualmente, a principal causa de cegueira em adultos em idade laboral no mundo ocidental. As lesões de retinopatia progridem distintamente em indivíduos diferentes, e um número limitado irá desenvolver as complicações que se associam a perda visual, o edema macular clinicamente significativo (EMCS) e a RD proliferativa, das quais o edema é a mais frequente.

Embora o controlo metabólico intensivo e o ajuste da pressão arterial diminuam a incidência e progressão da RD e do EMCS, as complicações persistem, sugerindo o papel de outros fatores de risco e uma provável influência genética.

O impacto da perda visual tem consequências humanas, comunitárias e económicas enormes e, aparentemente, o custo económico poderia ser reduzido pela deteção precoce e tratamento atempado da RD.

Na diabetes, o principal objetivo é prevenir a RD ou, quando inevitavelmente se desenvolvem as lesões de RD, intervir em fases precoces, assintomáticas, para preservar a visão.

É essencial compreender os mecanismos pelos quais a diabetes afeta a retina e melhorar os meios para a deteção precoce da doença. Identificar doentes em risco de desenvolver EMCS e perda visual, compreender as suas causas e progressão é fundamental para uma conduta terapêutica adequada e para evitar a perda visual e a incapacidade permanente.

O contributo que se pretende dar com esta tese baseia-se nos resultados de vários estudos que temos realizado nas fases iniciais da RD, na diabetes tipo 2, usando o optical coherence tomography (OCT), uma metodologia não invasiva que permite quantificar a espessura da retina e detetar alterações, desde as fases mais iniciais da doença retiniana na diabetes. Pretendemos, também, avaliar potenciais marcadores de risco de progressão das lesões retinianas para o desenvolvimento de EMCS.

Por outro lado, face ao uso crescente do OCT na prática clínica e em investigação, procuraremos estabelecer intervalos de valores da espessura da retina que permitam presumir a sua alteração, e portanto, a presença de doença.

No capítulo I, encontramos a introdução, algumas generalidades relativas à diabetes e aspetos gerais da RD, nomeadamente os mecanismos fisiopatológicos aparentemente envolvidos na lesão da unidade neurovascular da retina, a caracterização da história natural da doença retiniana e o rastreio comunitário da RD.

No capítulo II abordaremos o edema macular diabético, no que diz respeito a epidemiologia, fatores de risco e anatómicos/estruturais da área macular central com influência no seu desenvolvimento e a sua fisiopatologia. Discutiremos a classificação clínica do edema macular diabético e as principais limitações que apresenta, em particular na caracterização das fases mais iniciais da RD, que levou à crescente necessidade do uso, para melhorar a caracterização e o diagnóstico precoce, de métodos quantitativos e objetivos de avaliação da espessura da retina na área macular, como o retinal thickness analyzer (RTA) e o OCT. Faremos uma abordagem destas duas metodologias. Apresentaremos e discutiremos os estudos que realizámos com o OCT e com o RTA.

Assim, utilizámos o OCT e o RTA em doentes com diabetes tipo 2 nas fases iniciais da doença retiniana e mostrámos que, nestas fases, existem áreas localizadas de aumento da espessura da retina, por aumento da permeabilidade da barreira hemato-retiniana interna. Este pioneiro estudo foi publicado em 2002 na revista *Archives of Ophthalmology*.

Depois, usando o OCT, estudámos um grupo de 410 diabéticos para observar as alterações da espessura da retina que podem ocorrer precocemente na diabetes e avaliámos a progressão durante 2 anos de olhos com edema macular subclínico. Mostrámos que, nas fases iniciais da RD, ocorrem alterações distintas da espessura, em diferentes doentes, refletindo a diferente disfunção neurovascular na retina. Mostrámos, também, que o edema macular subclínico é um candidato órgão-específico a biomarcador de progressão da RD para EMCS. Estes trabalhos foram publicados na revista *Ophthalmologica*.



Estabeleceremos, com vários sistemas de OCT, intervalos de valores de espessura da retina que permitem presumir a sua alteração. Por fim, neste capítulo, será abordada a caracterização morfológica do edema macular diabético com o OCT, e proposta uma classificação.

No capítulo III encontram-se os artigos publicados e no capítulo IV estão as conclusões.

Acreditamos que os nossos resultados contribuem para uma melhor abordagem da conduta preventiva e personalizada da RD no futuro.



## **ABSTRACT**

Diabetes is a major public health problem, affecting progressively more people around the world. It is estimated that by 2035, the number of diabetics could reach 592 million.

Diabetic retinopathy (DR) is a common complication of diabetes, and is currently the leading cause of blindness in adults of working age in the western world. DR progress distinctly among different individuals, and only a limited number will develop sight-threatening complications of diabetes, clinically significant macular edema (CSME) and proliferative DR, which edema is the most common.

Although intensive metabolic and blood pressure control reduce the incidence and progression of DR and CSME, complications persist, suggesting roles for other risk factors and a possible genetic influence.

Vision loss has a major individual, communitarian and economic impact, and apparently economic costs could be reduced by early detection and timely treatment of DR.

In diabetes, the main goal is to prevent the development of DR. When DR lesions develop, efforts should be made to intervene at an early, asymptomatic stage in order to preserve vision.

It is essential to understand the mechanisms by which diabetes affects the retina and to improve the methods for early detection of the retinal disease. Identifying patients at risk to develop CSME and visual loss and understanding its causes and development is fundamental for its appropriate treatment and, finally, to avoid vision loss and disability due to diabetes.

The contribution of the present thesis is based on the results of several studies we have conducted in the early stages of DR in type 2 diabetes, using optical coherence tomography (OCT), a noninvasive method capable of measuring changes in retinal thickness from the early stages of DR. We also intend to evaluate potential biomarkers of DR progression to CSME. Moreover, given the growing use of OCT in clinical practice and research, we seek to establish intervals of retinal thickness which allow to presume disease presence.

In chapter I, we have the introduction, some generalities regarding diabetes, and we highlight aspects of DR, namely the pathophysiological mechanisms apparently involved in the damage of the neurovascular unit of the retina, the natural history of DR and DR screening programs.

In chapter II we discuss diabetic macular edema, with regard to epidemiology, risk factors and anatomic / structural central macular area factors with influence on its development and its pathophysiology. We discuss the clinical classification of diabetic macular edema and the main limitations it has, particularly in the characterization of the early stages of DR, which led to the increasing need to use objective and quantitative methods to improve the early diagnosis, like the retinal thickness analyzer (RTA) and OCT. We describe these two methodologies and the studies we have done using both.

We used the OCT and the RTA in patients with type 2 diabetes in the early stages of retinal disease and showed that in these stages there are localized areas of increased thickness, due to the breakdown of the blood-retinal barrier. This pioneering study was published in 2002 in the journal Archives of Ophthalmology.

Then, using the OCT, we studied a group of 410 diabetics to observe retinal thickness changes that may occur in the early stages of DR and evaluated the progression over 2 years of eyes with subclinical macular edema. We showed that in the early stages of DR different thickness changes occur in different patients, reflecting the different neurovascular dysfunction in the retina. We also showed that subclinical macular edema is an organ-specific candidate biomarker for progression of DR to CSME. These works were published in the journal Ophthalmologica.

We established, with various OCT systems, ranges of values of retinal thickness pointing to the presence of the disease. Finally, this chapter will look at the morphological characterization of diabetic macular edema with OCT, and a classification is proposed.

In Chapter III are the articles published, and in Chapter IV are the conclusions.

We believe that our results open better perspectives for a preventive and personalized management of DR in the near future.

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
<b>2. DIABETES MELLITUS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. RETINOPATIA DIABÉTICA</b> .....	<b>9</b>
3.1. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS INDUZIDOS PELA HIPERGLICEMIA .....	14
3.1.1. MECANISMOS MOLECULARES .....	15
3.1.2. MECANISMOS CELULARES .....	24
3.1.3. ALTERAÇÕES DO FLUXO SANGUÍNEO DA RETINA .....	34
3.1.4. ALTERAÇÕES FUNCIONAIS .....	36
3.2. HISTÓRIA NATURAL DA RD .....	37
3.2.1. RD PRÉ-CLÍNICA .....	37
3.2.2. RD NÃO PROLIFERATIVA .....	38
3.2.3. RD PROLIFERATIVA .....	43
3.3. RASTREIO DA RD .....	44
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>53</b>
<b>4. EDEMA MACULAR DIABÉTICO</b> .....	<b>55</b>
4.1. EPIDEMIOLOGIA .....	56
4.2. FATORES DE RISCO .....	58
4.2.1. CONTROLO GLICÉMICO .....	58
4.2.2. HIPERTENSÃO ARTERIAL .....	58
4.2.3. DISLIPIDEMIA .....	59
4.2.4. NEFROPATIA .....	59
4.2.5. ANEMIA .....	60
4.2.6. GLITAZONAS .....	60
4.2.7. GRAVIDEZ .....	60
4.3. FATORES ANATÓMICOS E ESTRUTURAIS .....	60
4.3.1. CAPILARES MACULARES .....	61
4.3.2. ÁREA MACULAR CENTRAL .....	61
4.3.3. BHR .....	62
4.3.4. RETINA NEUROSENSORIAL .....	63
4.3.5. VÍTREO .....	64
4.3.6. EPR .....	64
4.4. FISIOPATOLOGIA DO EDEMA MACULAR .....	65
4.4.1. EDEMA INTRACELULAR .....	65
4.4.2. EDEMA EXTRACELULAR .....	66
4.5. CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA RD E DO EMD .....	69
4.6. DIAGNÓSTICO DO EMD – CONTRIBUTO PESSOAL .....	73
4.6.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA DO EMD .....	76
4.6.2. RTA .....	80
4.6.2.1. INTRODUÇÃO .....	80

4.6.2.2.	INSTRUMENTAÇÃO.....	80
4.6.2.3.	ESPESSURA DA RETINA .....	83
4.6.2.4.	RESOLUÇÃO AXIAL E REPRODUTIBILIDADE .....	83
4.6.2.5.	ESPESSURA DA RETINA E COMPARAÇÃO RTA <i>VERSUS</i> OCT.....	84
4.6.3.	OCT .....	90
4.6.3.1.	INTRODUÇÃO.....	90
4.6.3.2.	PRINCÍPIOS DO OCT – SISTEMA <i>TIME - DOMAIN</i> .....	92
4.6.3.3.	INTERPRETAÇÃO DO OCT – SISTEMA <i>TIME - DOMAIN</i> .....	93
4.6.3.4.	REPRODUTIBILIDADE – SISTEMA <i>TIME - DOMAIN</i> .....	103
4.6.4.	OCT NO EMD .....	103
4.6.4.1.	DIAGNÓSTICO CLÍNICO DO EMD <i>VERSUS</i> DIAGNÓSTICO PELO OCT .....	103
4.6.4.2.	ESPESSURA DA RETINA .....	106
4.6.4.3.	SISTEMA DE OCT <i>SPECTRAL - DOMAIN</i> .....	121
4.6.4.4.	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO EMD.....	144
4.6.4.5.	RELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA DA RETINA E AV NO EMD .....	153
4.6.4.6.	CLASSIFICAÇÃO DO EMD BASEADA NO OCT .....	155
<b>CAPÍTULO III</b> .....		<b>159</b>
<b>5. ARTIGOS PUBLICADOS</b> .....		<b>161</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> .....		<b>179</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....		<b>181</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		<b>191</b>

## ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1. Marcação automática de microaneurismas (MAs) com o RetmarkerDR (Critical Health SA, Coimbra, Portugal).	39
Figura 2. Marcação de MAs numa fotografia a cores do fundo ocular.	40
Figura 3. Fotografias a cores do fundo ocular adquiridas durante o rastreio de RD.	48
Figura 4. RTA.	82
Figura 5. OCT Stratus TD. Imagem em secção ( <i>B-scan</i> ) obtida na área macular central de um indivíduo normal.	94
Figura 6. OCT Stratus TD, indivíduo normal.	97
Figura 7. OCT Stratus TD, indivíduo normal.	98
Figura 8. Fluxograma do estudo observacional.	111
Figura 9. OCT Stratus TD de um doente com edema macular diabético subclínico.	112
Figura 10. OCT SD. Imagem em secção da retina na área macular central, num indivíduo normal. Scan obtido com o OCT Cirrus.	122
Figura 11. OCT SD. Imagem em secção da retina na área macular central, num indivíduo normal. Scan obtido com o OCT Spectralis.	123
Figura 12. OCT SD, linhas de segmentação do <i>software</i> para cálculo da espessura da retina.	124





## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Espessura da retina normal, OCT Stratus TD.....	102
Quadro 2. Espessura da retina nas fases iniciais da RD com o OCT Stratus TD.....	119
Quadro 3. Espessura da retina normal, OCT SD. ....	129
Quadro 4. Espessura da retina normal, estudos de comparação entre sistemas de OCT TD e SD. ....	131
Quadro 5 – Conclusões. Valores de espessura da retina em $\mu\text{m}$ . ....	144



## SIGLAS E ABREVIATURAS

AF	Angiografia Fluoreceínica
AV	Acuidade Visual
BHR	Barreira Hemato-Retiniana
CPT	<i>Central Point Thickness</i>
CST	<i>Central Subfield Thickness</i>
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DM	Diabetes Mellitus
DRS	Diabetic Retinopathy Study
DRVS	Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study
EDIC	Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications
EMCS	Edema Macular Clinicamente Significativo
EMD	Edema Macular Diabético
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
HbA1c	Hemoglobina glicosilada A1c
ICAM-1	<i>InterCellular Adhesion Molecule-1</i>
MAs	MicroAneurismas
OCT	Optical Coherence Tomography
PFGA	Produtos Finais de Glicosilação Avançada
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
RD	Retinopatia Diabética
RDNP	Retinopatia Diabética Não Proliferativa
RDP	Retinopatia Diabética Proliferativa
RLA	Retinal Leakage Analyzer
RTA	Retinal Thickness Analyzer
TJ	<i>Tight Junction</i>
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetic Study
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WESDR	Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy



## Capítulo I



# 1. Introdução

O A diabetes mellitus (DM) é um dos principais problemas de saúde pública da atualidade, com impacto socioeconómico muito significativo.

Foi estimada uma prevalência mundial da diabetes de 8.3%, que corresponde a cerca de 382 milhões de indivíduos, e que pode aumentar para 592 milhões em 2035, refletindo um aumento conjunto da obesidade e da longevidade, e uma melhor deteção da doença (Wild *et al.* 2004). O número de indivíduos com diabetes tipo 2 está a crescer, em particular nas comunidades com dificuldade de acesso aos cuidados de saúde, nas quais é mais comum o pior controlo da doença metabólica e dos fatores de risco associados, nomeadamente da pressão arterial (Kiire *et al.* 2013). Em Portugal, no ano de 2012, foi reportada uma prevalência da diabetes de 12.9% em indivíduos com idade entre 20 e 79 anos, uma das mais elevadas da Europa.

A diabetes tem sido correlacionada com o desenvolvimento de complicações macrovasculares (doença coronária (Kawasaki *et al.* 2011), acidentes vasculares cerebrais (Cheung & Wong 2008), doença vascular periférica (Ricco *et al.* 2013)), e microvasculares (retinopatia, nefropatia (UKPDS 1990; Klein *et al.* 1994; Cruickshanks *et al.* 1993)). O aumento da diabetes aumenta a probabilidade de surgirem as complicações associadas, que devem ser prevenidas, antes da progressão para formas avançadas da doença.

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação frequente da diabetes e a principal causa de cegueira em adultos com 20 - 72 anos de idade no mundo ocidental.

Em alguns doentes, a progressão das lesões de RD pode levar ao desenvolvimento de duas complicações que se associam a perda de acuidade visual (AV), o edema macular clinicamente significativo (EMCS) e a RD proliferativa (RDP).

Embora o tratamento intensivo da hiperglicemia e da hipertensão arterial reduza as complicações da RD, existe uma grande variabilidade na progressão das lesões entre

indivíduos diferentes, ainda que realizando controlo metabólico intensivo, o que faz supor a influência de outros fatores de risco e de fatores genéticos.

O EMCS é a complicação que mais frequentemente se correlaciona com a perda visual na diabetes, em particular na diabetes tipo 2, e pode surgir desde as fases mais iniciais da doença retiniana. Ou seja, a identificação de olhos/doentes em risco de desenvolver EMCS e perda visual, compreender as suas causas e quais os fatores que se associam ao seu desenvolvimento e progressão é fundamental para uma conduta adequada dos doentes e, por fim, para evitar a perda visual associada à diabetes.

Neste contexto, pretendemos com esta tese dar um contributo para a identificação e caracterização das fases iniciais da doença retiniana na diabetes tipo 2 de forma não invasiva, usando o optical coherence tomography (OCT), bem como, avaliar um potencial biomarcador de progressão da RD para EMCS, o edema macular diabético (EMD) subclínico.

Por outro lado, face ao uso crescente do OCT na prática clínica e em investigação, procuraremos estabelecer intervalos de valores da espessura da retina que permitam presumir a sua alteração, e portanto, a presença de doença.



## 2. Diabetes Mellitus

A DM é uma doença sistémica crónica, caracterizada por persistência de hiperglicemia. É complexa, e requer uma avaliação e intervenção multidisciplinar. A diabetes afeta indivíduos de todas as idades e grupos socioeconómicos.

Os critérios de classificação e diagnóstico da DM baseiam-se nos trabalhos de um painel internacional de peritos, sob o patrocínio da American Diabetes Association (ADA 2003). Nesta classificação são incluídas 4 classes clínicas: diabetes tipo 1, que resulta da destruição de células  $\beta$  do pâncreas; diabetes tipo 2, que resulta de um defeito progressivo da secreção de insulina associado a resistência à sua ação; diabetes associada a outras causas, como doença do pâncreas, induzida por fármacos, causas genéticas; e a diabetes gestacional. A diabetes tipo 1 é menos frequente que a diabetes tipo 2, representando cerca de 5% dos casos de diabetes, parece ter forte componente genético e afeta predominantemente indivíduos da Europa mais antiga (Sivaprasad *et al.* 2012). A diabetes tipo 2 parece ter variação racial e estar mais correlacionada com fatores socioeconómicos, e menos provável origem genética (Sivaprasad *et al.* 2012). Os dois tipos variam consideravelmente na forma de apresentação clínica e progressão da doença.

A DM é, atualmente, um dos principais problemas de saúde pública. A diabetes é a principal causa de cegueira em adultos com 20 - 72 anos de idade (Romero-Aroca 2011; Ding & Wong 2012), de insuficiência renal e amputação dos membros inferiores (Humphrey *et al.* 1996; Sahakyan *et al.* 2011; Ricco *et al.* 2013), tem sido associada a doença coronária (Cheung, Wang, *et al.* 2007; Kawasaki *et al.* 2011) e acidente vascular cerebral (Cheung & Wong 2008).

Tem custos económicos enormes, relativos aos cuidados de saúde, perda de produtividade e rendimentos, oportunidades perdidas para o desenvolvimento económico. Em 2012 representou um custo direto estimado entre 1250 – 1500 milhões de euros, o que representa cerca de 0,8% do PIB português e 8 - 9% da despesa em saúde nesse ano (fonte: Direção Geral da Saúde).

De acordo com a 5ª edição do relatório anual do Observatório Nacional da Diabetes, estrutura integrada na Sociedade Portuguesa de Diabetologia, a diabetes atinge mais de 382 milhões de pessoas em todo o mundo, cerca de 8,3% da população mundial, e continua a aumentar em todos os países, estimando-se que, em 2035, este número possa aumentar para os 592 milhões de indivíduos afetados. Portugal é um dos países europeus com mais elevada taxa de prevalência de diabetes, que afetou, em 2012, cerca de 12,9% da população, com idade entre 20 e 79 anos. No mesmo grupo etário, a prevalência foi de 11,7% em 2009, de acordo com os dados do estudo PREVADIAD, o primeiro estudo de prevalência da diabetes realizado em Portugal (Gardete-Correia *et al.* 2010), que observou, também, um aumento da prevalência da diabetes no sexo masculino e com a idade: mais de 1/4 da população portuguesa no escalão etário 60 a 79 anos tem diabetes. Neste estudo foi também evidente a existência de um número elevado de casos de diabetes ainda não diagnosticada (Gardete-Correia *et al.* 2010), tal como observado nos EUA (Harris & Eastman 2000). Tal como a prevalência, a incidência da diabetes, tipo 1 e tipo 2, que corresponde ao número de novos casos por ano por 100.000 habitantes, também tem aumentado. Ainda de acordo com os dados constantes no relatório do Observatório Nacional da Diabetes, o número de internamentos de diabéticos com manifestações oftalmológicas e renais aumentou em 2012, face a anos anteriores, e, no que diz respeito às causas oftalmológicas, quase triplicou.

A diabetes tem sido correlacionada com complicações macrovasculares, como a doença coronária (Seeman *et al.* 1993; Stamler *et al.* 1993), acidentes vasculares cerebrais (Wong *et al.* 2002; Perros *et al.* 1997) e doença vascular periférica (Humphrey *et al.* 1996; Sahakyan *et al.* 2011), e complicações microvasculares, como a retinopatia e a nefropatia (Klein *et al.* 1984b; Haffner *et al.* 1988; Hamman *et al.* 1989; Hamman *et al.* 1991; UKPDS 1990; Klein *et al.* 2004). Em todo o mundo, a hipertensão e a obesidade, separadas ou conjuntamente, são co-morbilidades comuns em adultos com DM tipo 2 (Colosia *et al.* 2013).

O avultado aumento em todo o mundo da diabetes torna imperativo prevenir a RD e outras complicações, macro e microvasculares, antes do desenvolvimento de fases avançadas da doença. O tratamento intensivo da hiperglicemia reduz as complicações da DM e melhora a qualidade de vida, prolongando-a (DCCT 1996). Para além das óbvias consequências humanas, a prevenção de múltiplas complicações tem também, comprovadamente, um benefício económico significativo (DCCT 1996).



### 3. Retinopatia Diabética

A RD é a principal causa de cegueira no mundo ocidental, de acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde.

A RD é uma complicação frequente da diabetes (Cheung & Wong 2008). Na diabetes tipo 1 com duração de doença inferior a 5 anos, 17% dos doentes têm retinopatia (Klein *et al.* 1984a); na DM tipo 2 cerca de 40% dos doentes têm lesões de retinopatia na altura do diagnóstico e aproximadamente 22% desenvolverão RD nos 6 anos subsequentes (Stratton *et al.* 2001). Após 20 anos de hiperglicemia, quase 100% dos diabéticos tipo 1 e mais de 60% dos de tipo 2 têm algum grau de retinopatia (Klein *et al.* 1984b; Klein *et al.* 1984a).

Quatro alterações fundamentais caracterizam as fases iniciais da RD: o aparecimento de microaneurismas (MAs) e hemorragias, alteração da barreira hemato-retiniana (BHR), oclusão capilar e alteração das células neuronais e gliais da retina. Existem evidências crescentes de que a RD é uma doença da unidade neurovascular da retina que ocorre na diabetes (Cunha-Vaz *et al.* 2014; Antonetti *et al.* 2012; Stem & Gardner 2013).

A progressão das lesões de RD pode levar ao desenvolvimento, numa minoria de doentes, de duas complicações principais, o EMCS e a RDP, que se associam a perda de AV, que pode ser grave e permanente. Na DM tipo 1 a perda de AV ocorre mais frequentemente pela progressão para a forma proliferativa, tendo sido observada uma prevalência da RDP de cerca de 67% após 35 anos de duração da doença (Klein *et al.* 1984a); na DM tipo 2 a perda visual está mais frequentemente associada ao desenvolvimento de edema macular (Aiello *et al.* 1981; Bodansky *et al.* 1982; Romero-Aroca 2011; Aiello *et al.* 1998).

De entre os fatores que podem influenciar a evolução da doença retiniana, os mais importantes parecem ser o tipo de diabetes, tipo 1 ou 2, o nível de controlo metabólico (DCCT 1993; UKPDS 1998a; Chew *et al.* 2010), a duração da doença (Moss

*et al.* 1998; Ding & Wong 2012), o aumento da pressão arterial (Klein *et al.* 1984b; Klein *et al.* 1984c; Klein *et al.* 1984a; UKPDS 1998b) e a suscetibilidade genética (Arar *et al.* 2008; Hietala *et al.* 2008; Grassi *et al.* 2012; Saxena *et al.* 2007; Looker *et al.* 2007; Sobrin *et al.* 2011).

A história natural da RD não segue, contudo, um percurso rígido (Lobo *et al.* 2004). Pelo contrário, tem-se observado uma grande variabilidade na taxa de progressão da retinopatia em indivíduos diferentes (Zhang *et al.* 2010), mesmo quando submetidos a controlo metabólico idêntico (Klein *et al.* 1998; Nathan 1993; Klein *et al.* 1994; Lobo *et al.* 2004; Cunha-Vaz *et al.* 2014; Nathan *et al.* 2009), sugerindo o envolvimento de outros fatores de risco (Antonetti *et al.* 2012), bem como, de fatores genéticos que aumentam a suscetibilidade individual (Simó-Servat *et al.* 2013).

Estudos clínicos têm mostrado uma diminuição da incidência da RD pelo controlo agressivo da hiperglicemia (DCCT 1993; Stratton *et al.* 2001) e da hipertensão arterial (Stratton *et al.* 2001; DCCT 1993; UKPDS 1998b; Schrier *et al.* 2002). No entanto, no estudo Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), na diabetes tipo 1, o nível de glicemia, avaliado pelos valores de hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c), apenas explicava 11% do risco de desenvolvimento de RD, ou seja, 89% do risco deveria ser explicado por outros fatores (Lachin *et al.* 2008; Hirsch & Brownlee 2010). O United Kingdom Prospective Diabetic Study (UKPDS) foi o primeiro estudo a demonstrar um efeito entre a glicemia e a progressão da retinopatia (Stratton *et al.* 2001). Neste estudo observou-se, também, um efeito modesto do tratamento intensivo da diabetes na progressão da RD, tendo sido necessário um período de 6 anos para ver diferença entre os grupos de tratamento, convencional e intensivo. No entanto, presentemente, o nível de HbA1c permanece o único biomarcador sistémico validado para prever o desenvolvimento e progressão da RD (Cunha-Vaz *et al.* 2014; Antonetti *et al.* 2012; Hirsch & Brownlee 2010). Efetivamente, o controlo metabólico e a intensificação do ajuste da pressão arterial constituem a base do tratamento sistémico para a prevenção e tratamento da RD e de outras complicações da diabetes, em muitos doentes (Antonetti *et al.* 2012; Kiire *et al.* 2013).

É de salientar, também, que o estudo Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC), o prolongamento observacional do DCCT, introduziu o conceito de “memória metabólica”, ao constatar, após 10 anos de seguimento, uma persistente diferença no nível de RD, entre os grupos de doentes com controlo intensivo e convencional prévio, no estudo DCCT, e que continuava a favorecer o grupo com controlo intensivo inicial (White *et al.* 2008). A persistência do benefício do controlo glicémico restrito inicial, a “memória”, foi também observado no estudo UKPDS (Holman *et al.* 2008) e noutro estudo que decorreu na Dinamarca (Gaede *et al.* 2008).

Foi estimado que a influência da hereditariedade possa representar cerca de 27%, na RD, e cerca de 52% na RDP (Arar *et al.* 2008; Hietala *et al.* 2008). No entanto, presentemente, nenhum gene foi consensualmente aceite como de alto risco para o desenvolvimento da RD (Simó-Servat *et al.* 2013).

A base científica para a compreensão e conduta da RD surgiu de 5 ensaios clínicos multicêntricos, de larga escala: o Diabetic Retinopathy Study (DRS) (DRS 1976; DRS 1981b; DRS 1981a), o Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) (ETDRS 1985; ETDRS 1987; Kinyoun *et al.* 1989; ETDRS 1991c; ETDRS 1991e; ETDRS 1991a; ETDRS 1991d; Chew *et al.* 1996), o Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study (DRVS) (DRVS 1985; DRVS 1988; DRVS 1990), o DCCT, na diabetes tipo 1 (DCCT 1993; DCCT 1995b; DCCT 1995a; DCCT 1996; DCCT 1987), e o UKPDS, na diabetes tipo 2 (Kohner *et al.* 1998; UKPDS 1998a; UKPDS 1998b; Stratton *et al.* 2001; Matthews *et al.* 2004).

A fotocoagulação com laser tem sido o *gold standard* do tratamento das complicações oculares da DM nos últimos 35 anos. Em 1976 o estudo DRS mostrou o benefício da fotocoagulação panretiniana na RDP (DRS 1976), e 9 anos depois o estudo ETDRS mostrou que a fotocoagulação focal diminui o risco de perda moderada de AV no EMCS em cerca de metade dos doentes (ETDRS 1985). Mais recentemente, a administração intra-ocular de agentes que inibem o *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e de corticosteróides tem permitido um tratamento efetivo das complicações da RD, nos doentes para os quais o controlo metabólico é insuficiente (Osaadon *et al.*

2014; Mitchell *et al.* 2011; Shimura *et al.* 2008; Elman *et al.* 2011; Elman *et al.* 2010; Mohamed *et al.* 2007; Lam *et al.* 2007).

As estratégias de atuação na DM, e na RD, baseadas na evidência clínica, permitiram reduzir o risco de perda visual grave para menos de 2% (Aiello 2003). A incidência e o risco de progressão da RD diminuíram nos últimos 30 anos de quase 90% para menos de 50% (Antonetti *et al.* 2012). O Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR) mostrou que de 1980 para 2007, a incidência anual estimada de RDP diminuiu em cerca de 77% e a perda de AV diminuiu cerca de 57% nos diabéticos tipo 1 (Klein *et al.* 2010). Pessoas com diagnóstico recente de DM tipo 1 ou 2 têm um risco menor de desenvolver RDP, edema macular e perda visual, quando comparado com indivíduos com diagnóstico estabelecido em períodos anteriores (Hovind *et al.* 2003; Nordwall *et al.* 2004; Kempen *et al.* 2004; Sloan *et al.* 2008; Klein & Klein 2010). A redução da prevalência e incidência da RD e perda visual nas últimas décadas parece refletir uma melhoria do controlo metabólico, dos níveis de pressão arterial e de lípidos séricos (Klein & Klein 2010), e a implementação de programas educacionais e de rastreio adequados (DCCT 1993; UKPDS 1998a; UKPDS 1998b).

Todavia, o número crescente de indivíduos com diabetes, resultado do envelhecimento da população, sedentarismo e obesidade, e hábitos alimentares não saudáveis, coloca em risco de desenvolvimento de RD e complicações uma grande proporção da população. E, apesar dos avanços na conduta da DM, as complicações persistem. Efetivamente, a RD é, nos nossos dias, a principal causa de cegueira em adultos em idade laboral no mundo ocidental (Moss *et al.* 1998; Cunha-Vaz *et al.* 2014; Romero-Aroca 2011; Ding & Wong 2012), e portanto uma causa importante de incapacidade, associada a diminuição da AV, dificuldade em ler, conduzir e desempenhar tarefas diárias, nefropatia, por vezes, inevitável desemprego, com enorme impacto na qualidade de vida dos doentes (Hirai *et al.* 2011). O atraso no diagnóstico e tratamento parece ser a principal razão para a perda da AV, evitável com rastreio adequado (Javitt & Aiello 1996; Lawrence 2004).



Ou seja, grande ênfase deverá ser dado à prevenção das complicações, o que exige uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a diabetes afeta a retina e melhorar os meios para detetar a RD. O diagnóstico precoce permite delinear estratégias terapêuticas, sistémicas e oculares, oportunas (DCCT 1993; DCCT 1995a; Stratton *et al.* 2001; Matthews *et al.* 2004; Elman *et al.* 2010; Chew *et al.* 2010; Wright & Dodson 2011). O tratamento com laser revelou-se mais eficaz na prevenção da diminuição da AV quando aplicado a fases de RD específicas, frequentemente assintomáticas (DRS 1981b; ETDRS 1985; Bailey *et al.* 1999). Recentemente, em doentes tratados com agentes anti-VEGF, foi também constatado um benefício menor (menor ganho de AV) no grupo em que foi inicialmente protelado o tratamento intravítreo (Brown *et al.* 2013).

Em termos comunitários, existem ainda muitos indivíduos diabéticos que não frequentam consultas de oftalmologia regulares, para os quais a implementação de programas de rastreio da RD tem sido fundamental para reduzir o risco de perda visual. O rastreio da RD tem como principal objetivo a identificação precoce e referenciação para um oftalmologista de doentes com sinais de lesões de RD que ameaçam a visão (edema macular/RDP) (Kiire *et al.* 2013). Foi observado que, em países com programas estabelecidos de rastreio de RD, a incidência e prevalência de casos de cegueira relacionados com a diabetes tem diminuído (Arora *et al.* 2012).

Na diabetes, a retinopatia pode evoluir lentamente, de forma assintomática, durante muito tempo, sem perda de AV, o que tem suscitado a necessidade de meios alternativos para a deteção precoce de sinais de progressão e gravidade da doença, não baseados (somente) na avaliação da AV.

A fundoscopia e a fotografia a cores do fundo ocular realizadas regularmente, sob midríase farmacológica, permitem detetar lesões de RD que ameaçam a visão (Singer *et al.* 1992), e comprovadamente previnem a cegueira, mas são métodos insensíveis para avaliar variações ligeiras da espessura da retina (N. M. Bressler *et al.* 2012; Brown *et al.* 2004; van Dijk *et al.* 2010; van Dijk *et al.* 2012), áreas de oclusão capilar ou sinais

precoces de lesão neuronal (Han, Adams, *et al.* 2004; Bronson-Castain *et al.* 2009), que ocorrem nas fases iniciais da RD.

Os métodos tradicionais estão a ser suplementados por métodos de avaliação da função e da estrutura da retina mais sensíveis, que permitem reconhecer o envolvimento precoce da retina na diabetes. Por exemplo, em doentes com lesões iniciais de RD, o OCT tem mostrado diminuição da espessura das camadas da retina interna (van Dijk *et al.* 2010; van Dijk *et al.* 2012) e edema subclínico da retina (N. M. Bressler *et al.* 2012; Browning & Fraser 2008); o eletrorretinograma mostrou que áreas com diminuição das respostas eletrorretinográficas podem prever a subsequente localização de lesões microvasculares (Harrison *et al.* 2011).

Atualmente, o desafio consiste em identificar biomarcadores oculares específicos de progressão da RD e resposta ao tratamento, e caracterizar diferentes fenótipos da doença, com diferentes riscos de desenvolvimento das complicações da RD que ameaçam a visão, para avaliar de forma sensível, quantitativa e preditiva a gravidade da retinopatia. Pretende-se identificar precocemente quais os doentes em risco de progressão da doença e intensificar a vigilância para estabelecer quando e como tratar. O reconhecimento de biomarcadores abre pois a perspetiva de uma conduta preventiva e personalizada da RD.

Estudos clínicos para avaliação do impacto e eficácia de novas estratégias terapêuticas farmacológicas para impedir o desenvolvimento e progressão da RD, nomeadamente antioxidantes, inibidores da *protein kinase C* (PKC), ou outras, requerem um esforço no sentido do desenvolvimento de biomarcadores da doença, e da definição de novos objetivos no decurso de ensaios clínicos.

### **3.1. Mecanismos Fisiopatológicos induzidos pela Hiperglicemia**

A RD é uma das principais causas de cegueira no mundo ocidental, para a qual não existe tratamento preventivo eficaz. Para o desenvolvimento de novas estratégias

terapêuticas é essencial uma melhor compreensão e detecção da fase pré-clínica, assintomática, da doença.

A patogenia da RD é complexa, multifatorial, e não completamente elucidada. A maioria da informação existente provém de estudos em animais, com diabetes induzida, ou situações experimentais de cultura celular.

A retina consiste em 3 tipos principais de células: neurónios, células gliais e vasos sanguíneos. Todos estes tipos celulares são afetados, em alguma extensão, na RD (Cunha-Vaz *et al.* 2014; Antonetti *et al.* 2012). As alterações mais precoces detetadas clinicamente na retina na diabetes são a rutura da BHR e as alterações da função da retina neurosensorial (Cunha-Vaz *et al.* 2014).

A exposição que se segue fará referência a alterações moleculares, celulares, vasculares e funcionais que caracterizam as fases mais iniciais/precoces da RD, salientando, em particular, os mecanismos subjacentes à rutura da BHR, que levam ao desenvolvimento do edema macular, diretamente envolvidos na fisiopatologia da RD.

Existe evidência de que apenas a forma não proliferativa da RD é diretamente associada à doença sistémica e hiperglicemia associada e outras alterações metabólicas (Cunha-Vaz 1978). A RDP surge após o desenvolvimento de extensa isquemia por oclusão capilar. Os neovasos são uma consequência natural da isquemia da retina, e evoluem independentemente da influência do controlo metabólico da diabetes (Cunha-Vaz 1978). As alterações tardias, observadas na fase proliferativa, devem-se pois, essencialmente, à progressão da isquemia da retina, e suas complicações, e são, aparentemente, independentes da doença metabólica sistémica.

### **3.1.1. Mecanismos Moleculares**

Estudos em animais diabéticos mostraram que a hiperglicemia é o principal fator desencadeador dos mecanismos patológicos a nível da retina (Vlassara 1997; King & Brownlee 1996; Engerman & Kern 1984; Kern & Engerman 1996). Em humanos, os

estudos DCCT e UKPDS também estabeleceram que a hiperglicemia é a causa iniciadora da lesão tecidual diabética que observamos clinicamente (DCCT 1993; UKPDS 1998a), num processo aparentemente modificado por determinantes genéticos, de suscetibilidade individual, e pela contribuição de fatores independentes, como a hipertensão.

A lesão tecidual associada à hiperglicemia envolve alguns subgrupos celulares, que incluem a célula endotelial capilar da retina, as células do mesângio do glomérulo renal e os neurónios e células de Schwann, nos nervos periféricos (Brownlee 2005). O envolvimento preferencial destes tipos celulares dever-se-á à falta de eficiência destas células em manter uma concentração interna de glicose constante, quando expostas à hiperglicemia (Kaiser *et al.* 1993; Heilig *et al.* 1995).

Assim, a hiperglicemia crónica e sustentada desencadeia mecanismos celulares e moleculares que determinam, a longo-prazo, as alterações vasculares, isto é, a disfunção da célula endotelial, que caracterizam a RD, e que podem levar ao EMD e à RDP (neovascularização).

A glicose é transportada para o citoplasma das células endoteliais da BHR interna maioritariamente através do transportador de membrana *glucose transporter-1* (GLUT-1). A expressão do GLUT-1 é modulada pela hipoxia, fatores de crescimento e glicose (Mandarino *et al.* 1994; Takagi *et al.* 1998). Em situação de hiperglicemia e/ou hipoxia, o GLUT-1 transporta mais glicose para o interior da célula endotelial.

Os mecanismos metabólicos que têm sido propostos como mediadores da toxicidade intracelular da hiperglicemia incluem a ativação da via do poliol (Brownlee 2001; Brownlee 2005; King *et al.* 1994; Lorenzi 1992); o aumento da formação de produtos finais de glicosilação avançada (PFGA), a ativação induzida por hiperglicemia de isoformas da PKC e o aumento do fluxo pela via da hexosamina e consequente modificação de proteínas pela N-acetilglicosamina.

### **Via do Poliol**

Esta via depende da enzima aldose redutase, que normalmente reduz aldeídos tóxicos da célula em álcoois inativos. Quando a concentração intracelular de glicose se torna muito elevada, a aldose redutase também reduz a glicose a sorbitol (que depois é oxidada a frutose), num processo que consome o cofator NADPH, essencial para regenerar a glutatona reduzida (Lee & Chung 1999). Ao reduzir a quantidade de glutatona reduzida, a via do poliol aumenta a suscetibilidade para o *stress* oxidativo intracelular (Lee & Chung 1999; Brownlee 2005).

### **Glicosilação Proteica**

De acordo com o conceito de glicosilação não enzimática (Brownlee 1994), a glicose liga-se por covalência com moléculas reativas, provocando alteração na função de proteínas, ácidos nucleicos e lípidos (Stirban *et al.* 2014; Singh *et al.* 2014). Esta reação leva à formação de proteínas glicosiladas, de que a HbA1c é um exemplo, e cuja dosagem dá uma indicação do controlo metabólico nos últimos 2-3 meses (Kennedy & Baynes 1984). Os PFGA podem ser caracterizados por uma pigmentação castanha própria, pela fluorescência que apresentam, assim como pela tendência para estabelecer ligações cruzadas estáveis (Brownlee *et al.* 1984b). Este processo contribui para o espessamento da membrana basal.

Os PFGA lesam as células aparentemente por 3 mecanismos. O primeiro inclui a modificação de proteínas intracelulares, incluindo proteínas envolvidas na regulação da transcrição de genes (Giardino *et al.* 1994; Shinohara *et al.* 1998). O segundo consiste na observação de que os PFGA podem difundir para fora da célula e modificar moléculas da matriz extracelular adjacente (McLellan *et al.* 1994), o que altera a sinalização entre a matriz e a célula e causa disfunção celular (Charonis *et al.* 1990). O terceiro mecanismo consiste na difusão de PFGA para a corrente sanguínea e consequente modificação de proteínas circulantes, nomeadamente a albumina (Singh *et al.* 2014). As proteínas circulantes assim modificadas podem unir-se a recetores de PFGA e ativá-los, levando à produção de citocinas inflamatórias e fatores de

crescimento, com disfunção vascular (Li *et al.* 1996; Vlassara *et al.* 1995; Abordo & Thornalley 1997; Vlassara *et al.* 1988; Singh *et al.* 2014; Stirban *et al.* 2014).

### **Ativação da PKC**

Nesta via a hiperglicemia intracelular aumenta a síntese do diacilglicerol, que é um ativador endógeno das isoformas clássicas da enzima PKC ( $\beta$ ,  $\delta$  e  $\alpha$ ) (Koya & King 1998; Xia *et al.* 1994; King & Brownlee 1996). A atividade da PKC está aumentada nos diferentes órgãos mais suscetíveis às complicações da diabetes (King & Brownlee 1996; Koya & King 1998). A PKC, enzima com atividade fosforilizante, quando ativada pela hiperglicemia intracelular, altera a expressão genética de várias proteínas com efeitos deletérios sobre a célula. Diminui a produção de óxido nítrico, vasodilatador, e aumenta a produção de endotelina-1, vasoconstritora; aumenta a produção de VEGF, que aumenta a permeabilidade vascular e estimula a angiogénese; aumenta o fator de crescimento transformador- $\beta$ , com aumento de colagénio e fibronectina, e consequente oclusão capilar; aumenta o inibidor do ativador do plasminogénio-1, de que resulta diminuição da fibrinólise e oclusão vascular; aumenta o fator nuclear, um fator de transcrição que ativa a expressão de genes pró-inflamatórios; e aumenta as oxidases de NAD(P)H, o que aumenta as espécies reativas de oxigénio, com efeitos múltiplos sobre a célula (Brownlee 2005). Através de uma variedade de mecanismos diretos e indiretos, a ativação da PKC contribui para a fisiopatologia da RD (Donnelly *et al.* 2004; Williams *et al.* 1997; Aiello *et al.* 1997). Estudos animais mostraram que a inibição da PKC previne as alterações precoces da diabetes na retina e no rim (Ishii *et al.* 1996; Koya *et al.* 2000).

### **VEGF e Angiogénese**

Em condições fisiológicas, o VEGF está envolvido nos processos de embriogénese, cicatrização e inflamação (Witmer *et al.* 2003). Em condições patológicas está envolvido no crescimento tumoral, artrite, doenças cardíacas e várias doenças oculares (Witmer *et al.* 2003). O VEGF refere-se a uma família de polipeptídeos, com número

variável de aminoácidos, que incluem 5 tipos: VEGF A, B, C, D e E, que derivam do mesmo gene, e atuam em receptores tirosina quinase (D'Amore 1994).

Na retina, o VEGF é produzido pelas células do epitélio pigmentado da retina (EPR), células ganglionares, células de Müller, pericitos e células endoteliais (Murata *et al.* 1996; Hammes *et al.* 1998; Lutty *et al.* 1996). O VEGF-A está particularmente envolvido na disfunção da BHR e na patogenia de muitas doenças oculares, com componente de angiogênese, nomeadamente a degenerescência macular relacionada com a idade e a RD/EMD (Aiello *et al.* 1994; Hammes *et al.* 1998; Clermont *et al.* 1997; Witmer *et al.* 2003). É, atualmente, o indutor da angiogênese ocular e permeabilidade vascular mais estudado e conhecido (Antonetti *et al.* 1999; Murata *et al.* 1996; Siemerink *et al.* 2010; Witmer *et al.* 2003).

A sua síntese é regulada por vários estímulos, sendo o nível de oxigénio no meio celular (hipoxia) o mais conhecido (Witmer *et al.* 2003). A produção de VEGF aumenta em condições de isquemia da retina (D'Amore 1994). Pensa-se, também, que a hipoxia poderá induzir um fator, o fator induzido pela hipoxia-1, que é o principal regulador da homeostasia do oxigénio, e que controla genes, e a expressão de proteínas específicas, que incluem o VEGF, o GLUT-1. Desta forma, o fator induzido pela hipoxia-1 poderá mediar a rutura da BHR, provavelmente através da ação do VEGF; estimular a angiogênese, para criar oxigenação; mas também parece influenciar a sobrevivência das células neuronais (Klaassen *et al.* 2013). Para além da isquemia/hipoxia, a indução/libertação de VEGF parece ser também influenciada por outros fatores, como a angiotensina II (vasoconstritora), processos oxidativos, inflamação, oncogenes e outros fatores de crescimento.

O VEGF é cerca de 50 000 vezes mais potente que a histamina na indução da permeabilidade vascular. A capacidade do VEGF para induzir rutura da BHR interna, e aumentar a permeabilidade vascular, parece surgir de distintos mecanismos, não mutuamente exclusivos, que afetam as vias paracelular (Antonetti *et al.* 1999; Esser *et al.* 1998; Harhaj & Antonetti 2004) e transcelular (Feng *et al.* 1997). O mecanismo de

indução da permeabilidade vascular pelo VEGF envolve a ativação de isoformas da PKC, em particular a PKC- $\beta$  (Xia *et al.* 1996; Ishii *et al.* 1996; Harhaj *et al.* 2006). A ocludina, uma proteína estrutural das *tight junctions* (TJ), parece ser um alvo da PKC- $\beta$ , que leva a endocitose mediada por ubiquitina dos componentes das TJ e aumento da permeabilidade (Murakami *et al.* 2009; Murakami, Frey, *et al.* 2012). Adicionalmente, o VEGF também parece induzir a leucostase e morte da célula endotelial (Ishida *et al.* 2003). Patel *et al.* observaram uma forte relação entre a rutura da BHR, níveis aumentados de VEGF e o edema macular (Jignesh I Patel *et al.* 2006). Efetivamente, estudos recentes têm mostrado que, na RD, o tratamento com agentes anti-VEGF se associa a uma redução da neovascularização (Osaadon *et al.* 2014) e do edema macular (Mitchell *et al.* 2011).

A angiogénese, ou o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré existentes (Kaiser 2006; Andreoli & Miller 2007), é um componente importante da RD e da degenerescência macular relacionada com a idade (Witmer *et al.* 2003; Bhisitkul 2006). As moléculas que estimulam o crescimento incluem polipeptídeos reguladores do crescimento, como o VEGF, o fator de crescimento dos fibroblastos, a interleucina-8, o fator de crescimento *insulina-like* e o fator de crescimento do hepatócito, que podem exercer a ação na forma solúvel ou unir-se à superfície celular ou à matriz extracelular (D'Amore 1994). Potenciais inibidores do crescimento incluem o fator de crescimento transformador- $\beta$  (solúvel) e alguns constituintes da matriz extracelular (D'Amore 1994); o fator derivado do epitélio pigmentado (Dawson *et al.* 1999). O VEGF, produzido em resposta a vários estímulos, em particular a hipoxia, aumenta a permeabilidade vascular (Ferrara *et al.* 1992; Aiello *et al.* 1997), e é um potente fator angiogénico e mitógeno da célula endotelial (Bhisitkul 2006). O fator derivado do epitélio pigmentado comporta-se de forma oposta ao VEGF, diminuindo de concentração quando o oxigénio é limitado, e aumentando em condições de boa oxigenação (Dawson *et al.* 1999). Assim, o balanço entre os níveis de VEGF e fator derivado do epitélio pigmentado têm sido associados à neovascularização (Jignesh I Patel *et al.* 2006), mas também, ao aumento da permeabilidade vascular e EMD (Funatsu *et al.* 2006).



Adicionalmente, a hiperglicemia induz a produção de outros fatores de crescimento, para além do VEGF-A, nomeadamente o fator de crescimento do tecido conjuntivo, o fator de crescimento do hepatócito, o fator de crescimento derivado das plaquetas, que têm sido associados ao desenvolvimento e progressão das lesões de RD (Cui *et al.* 2007; Hinton *et al.* 2002; Jignesh I Patel *et al.* 2006; Van Geest *et al.* 2010).

### **Via da Hexosamina**

A maioria da glicose intracelular é metabolizada através da via glicolítica, transformando-se em glicose-6 fosfato, depois em frutose-6 fosfato. Todavia, uma parte da frutose-6 fosfato entra numa via divergente, na qual a enzima GFAT (glutamina: frutose-6 fosfato amidotransferase) converte a frutose-6 fosfato em glicosamina-6 fosfato e, finalmente, em UDP (uridina difosfato) N-acetilglucosamina. A posterior modificação desta N-acetilglucosamina, nomeadamente fosforilação, resulta em alterações patológicas da expressão genética (Kolm-Litty *et al.* 1998; Sayeski & Kudlow 1996), e consequente aumento da expressão proteica. O aumento do fator de crescimento transformador- $\beta$ 1 e do inibidor do ativador do plasminogénio-1 tem sido associado a efeitos nocivos sobre os vasos sanguíneos (Du *et al.* 2000).

### **Stress Oxidativo**

Ensaio clínico com inibidores isolados destas vias têm tido resultados decepcionantes, o que fez supor a existência de um processo precipitador prévio, comum às 4 vias. Estes diferentes mecanismos patogénicos são, provavelmente, ativados por um evento inicial, único, induzido pela hiperglicemia, e que parece ser a excessiva produção de espécies reativas do oxigénio, e especificamente o anião superóxido, pela cadeia respiratória mitocondrial (Brownlee 2005). Efetivamente, estudos clínicos mostraram que as linhas celulares sensíveis à hiperglicemia apresentam um aumento da produção de espécies reativas do oxigénio (Du *et al.* 2000; Nishikawa *et al.* 2000).

A cadeia transportadora de eletrões na mitocôndria tem 4 complexos proteicos (I, II, III e IV). Na célula “normal” a glicose é metabolizada através do ciclo do ácido tricarbóxico e gera dadores de eletrões, dos quais o principal é o NADH (que dá eletrões ao complexo I), e outro dador de eletrões é o FADH<sub>2</sub> (que dá eletrões ao complexo II). Os eletrões destes complexos passam à coenzima Q, depois para o complexo III, citocromo-C, complexo IV e, finalmente, ao oxigénio molecular, que reduzem a água. Este sistema é regulado para que a síntese de ATP seja precisamente controlada. Quando existem níveis elevados de glicose dentro da célula, mais dadores de eletrões (NADH, FADH<sub>2</sub>) são empurrados para a cadeia transportadora de eletrões, o gradiente de voltagem através da membrana mitocondrial aumenta e a transferência para o complexo III é bloqueada (Korshunov *et al.* 1997). Os eletrões voltam para a coenzima Q, que os transfere para o oxigénio molecular, gerando superóxido. A enzima superóxido dismutase (isoforma mitocondrial) degrada este radical livre de oxigénio em peróxido de hidrogénio, depois convertido, por outras enzimas, em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>.

A hipótese do mecanismo “unificador”, para explicar a patogenia da doença microvascular diabética, foi proposta por Brownlee (Brownlee 2005; Brownlee 2001). Assim, a hiperglicemia intracelular provoca aumento da produção mitocondrial de espécies reativas do oxigénio. As espécies reativas do oxigénio provocam ruturas na cadeia do DNA nuclear e ativam a enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). A PARP ativada modifica a enzima glicolítica chave, a gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH), com polímeros de ADP-ribose (Du *et al.* 2003), o que reduz a sua atividade e aumenta todos os intermediários da via glicolítica. Por fim, a diminuição da atividade da GAPDH ativa, a diferentes níveis, as 4 vias que têm sido associadas à lesão celular induzida pela hiperglicemia, anteriormente discutidas (a via do poliol, o aumento da produção intracelular de PFGA, a ativação da PKC e a via da hexosamina).

Ou seja:

Hiperglicemia intracelular → excesso de produção mitocondrial de espécies reativas do oxigênio → ativação da enzima PARP → modificação da GAPDH (acumulação de polímeros de ADP-ribose) → inibição da GAPDH → ativação das 4 vias principais de lesão associada à hiperglicemia (Brownlee 2005).

Adicionalmente, o excesso de superóxido pode, por si mesmo, inibir diretamente enzimas endoteliais, sem envolvimento das 4 vias descritas. Duas destas enzimas, particularmente importantes na biologia vascular, são a sintetase do óxido nítrico e a sintetase da prostaciclina, dramaticamente inibidas na diabetes (Brownlee 2005).

Novas abordagens terapêuticas poderão surgir, baseadas em alvos ao longo destas vias propostas para a patogenia das complicações da diabetes. Nomeadamente: ativação da transquetolase – para diminuir a concentração dos metabolitos glicolíticos; inibidores da PARP – para impedir a ativação das 4 vias; antioxidantes catalíticos – para evitar a inativação da sintetase do óxido nítrico e da sintetase da prostaciclina pelo excesso de superóxido.

Finalmente, a disfunção da célula endotelial induzida pela hiperglicemia também poderá envolver a expressão de proteínas de adesão nas células endoteliais e promover a adesão de monócitos e leucócitos, isto é, leucostase, que podem levar à morte da célula vascular, com consequente formação de capilares acelulares e isquemia retiniana irreversível (Joussen *et al.* 2002; Joussen *et al.* 2001; Rahman *et al.* 2007).

Em resumo, dados de experimentação animal têm revelado uma associação entre inúmeros fatores, incluindo os PFGA, VEGF, fator de crescimento transformador, PKC- $\beta$ , aumentados pela hiperglicemia crónica, e a rutura da BHR na RD e no EMD, que deverão ser extrapolados para o contexto humano com precaução. Presentemente, o uso crescente e universal dos fatores anti-VEGF, para tratamento do EMD, tornou-se uma opção terapêutica muito importante (Mitchell *et al.* 2011; Massin *et al.* 2010;

Brown *et al.* 2013; Nguyen *et al.* 2012). A intervenção terapêutica sobre outros alvos, nomeadamente a inflamação, é atualmente objeto de vários ensaios clínicos.

### 3.1.2. Mecanismos Celulares

A RD tem sido considerada uma complicação microvascular da diabetes, com início na célula endotelial dos capilares da retina, cuja disfunção conduz a edema macular e isquemia da retina (Cunha-Vaz 2001; Cunha-Vaz 1978). O edema macular parece resultar de alteração da permeabilidade vascular nos capilares da retina por rutura da BHR interna (Cunha-Vaz *et al.* 2011). A isquemia da retina surge na sequência da diminuição de capilares perfundidos ou da sua oclusão (Joussen *et al.* 2001; Arend *et al.* 1997; Remky *et al.* 2000; Boeri *et al.* 2001). O endotélio vascular constitui a BHR interna, formada por TJ entre as células endoteliais dos capilares, funcionando como um regulador da permeabilidade, da coagulação sanguínea e sintetizando proteínas extracelulares (Porta 1996) e fatores de crescimento (King & Brownlee 1996; Porta 1996) e, tal como outros vasos do organismo, tem uma superfície não trombogénica para o fluxo sanguíneo (Sena *et al.* 2013). Precocemente no decurso da diabetes ocorre disfunção endotelial e rutura da BHR interna (Vinores *et al.* 1993; Vinores *et al.* 1989; Cunha-Vaz *et al.* 1975; Cunha-Vaz & Bernardes 2005).

Todavia, têm surgido evidências de que os outros tipos celulares da retina, neurónios, células de Muller, astrócitos e células da microglia, sejam também afetados, precocemente, pela diabetes (Gardner *et al.* 2000; Lorenzi & Gerhardinger 2001; Antonetti *et al.* 2012). Alguns autores consideraram a RD uma doença ocular neurodegenerativa, para além de uma doença microvascular (Barber 2003).

Recentes observações sugerem que a disfunção da retina associada à diabetes deve ser considerada como uma alteração que afeta inicialmente diferentes componentes da unidade neurovascular da retina, em diferentes doentes (Antonetti *et al.* 2012; Cunha-Vaz *et al.* 2014). A unidade neurovascular da retina refere-se à relação física e bioquímica entre neurónios, células gliais e vasos da retina, e à estreita interdependência destes tecidos que ocorre no sistema nervoso central e na retina

(Antonetti *et al.* 2012). Esta íntima associação entre células gliais, neurónios e vasos sanguíneos permite uma homeostasia de energia e regulação de neurotransmissores. A sua interdependência manifesta-se, também, na BHR, que controla o fluxo de fluidos de e para o tecido retiniano (Cunha-Vaz 1979). O facto de que o tratamento das complicações vasculares na retina preserva a AV em doentes com RD realça a interligação da retina neural com a retina vascular e a unidade neurovascular funcional na retina (Antonetti *et al.* 2012).

Os componentes da unidade neurovascular parecem ser envolvidos em diferentes graus, em indivíduos diferentes (Cunha-Vaz *et al.* 2014). Nem todos os doentes apresentam uma alteração detetável da BHR nas fases iniciais da doença (Cunha-Vaz *et al.* 1975), e nem todos os doentes apresentam alterações eletrofisiológicas na mesma fase da doença (Bears *et al.* 2006; Bronson-Castain *et al.* 2009).

A alteração da BHR, a lesão neuronal e a inflamação parecem ser as alterações mais relevantes que ocorrem nas fases iniciais da doença retiniana na diabetes (Cunha-Vaz *et al.* 2014).

### **BHR e Rutura da BHR**

Na retina existe a BHR, uma barreira fisiológica, peculiarmente restritiva, composta por células unidas, e “seladas”, por estruturas juncionais, as TJ (Shakib & Cunha-Vaz 1966). Esta barreira regula o movimento de água, iões e proteínas de e para o tecido retiniano (Shakib & Cunha-Vaz 1966; Cunha-Vaz *et al.* 2011), protegendo-o de substâncias sanguíneas nocivas.

Na diabetes humana e experimental a rutura da BHR tem sido demonstrada desde as fases mais iniciais da doença retiniana, e em cerca de 30 – 40% dos doentes antes do aparecimento de lesões visíveis na fundoscopia (Cunha-Vaz *et al.* 1975; Cunha-Vaz *et al.* 1986; Cunha-Vaz *et al.* 1979; Waltman *et al.* 1978). A rutura da BHR aumenta com a duração da doença, correlacionando-se com a sua progressão, e está associada

a mau controlo metabólico (Cunha-Vaz *et al.* 1986). Conduz a expansão extracelular e edema da retina.

A BHR é formada por 2 componentes, a BHR interna, formada por TJ entre as células endoteliais dos capilares da retina, comparável à barreira hemato-encefálica, e a BHR externa, formada por TJ entre as células do EPR (Cunha-Vaz 1976). A transferência de metabolitos da circulação para a retina, através da barreira, é seletivo, limitada à via paracelular, para a água e pequenos solutos, regulada pela abertura e encerramento das junções interendoteliais; e à via transcelular, que envolve mecanismos vesiculares (Feng *et al.* 1999) e transportadores de membrana, para macromoléculas, como a albumina e a insulina (Klaassen *et al.* 2013; Klaassen *et al.* 2009).

Estruturalmente, as TJ são constituídas por proteínas, que podem ser estruturas transmembranares, como a ocludina; as claudinas, pequenas; a molécula de adesão juncional; ou estruturas intracelulares, como as *zonula occludens-1, 2 e 3*; a cingulina; a 7H6; a simplequina.

A diabetes parece induzir alterações na expressão proteica das TJ, ou alterar a sua distribuição na superfície celular (Klaassen *et al.* 2013; Antonetti *et al.* 1999; Murakami, Frey, *et al.* 2012), e assim conduzir à rutura da BHR e aumento da permeabilidade paracelular. Em animais com diabetes induzida experimentalmente, foi demonstrada uma diminuição do conteúdo de ocludina (Antonetti *et al.* 1998), bem como, uma redistribuição desta proteína transmembranar na superfície celular (Barber *et al.* 2000). Mais tarde, foi também observada a diminuição de outras TJ, como a claudina (Bucolo *et al.* 2009; Klaassen *et al.* 2009) e a *zonula occludens-1* (Leal *et al.* 2007).

O VEGF tem sido amplamente implicado na patogenia da rutura da BHR (Wilkinson-Berka 2004). A forma como o VEGF aumenta a permeabilidade da BHR não é completamente esclarecida, e tem sido alvo de intensa investigação nos últimos anos. Aiello *et al.* mostraram que o VEGF aumenta a permeabilidade da BHR através de

um efeito mediado por ativação e translocação da PKC (Aiello *et al.* 1997). Outros estudos mostraram que o VEGF altera a estrutura das TJ endoteliais, provavelmente através da PKC, diminuindo o seu conteúdo em ocludina (Antonetti *et al.* 1998), ou induzindo fosforilação da ocludina e da *zonula occludens-1* (Antonetti *et al.* 1999). De facto, a fosforilação da ocludina parece ser um processo importante na regulação da permeabilidade da barreira endotelial (Antonetti *et al.* 2002). A eficácia do tratamento do EMD com agentes anti-VEGF (Massin *et al.* 2010; Nguyen *et al.* 2009; Do *et al.* 2013; Mitchell *et al.* 2011) indica que o VEGF contribui para a patogenia do EMD e reflete o sucesso da investigação translacional.

Similarmente, o fator de crescimento derivado das plaquetas também pode alterar as TJ e aumentar a permeabilidade da barreira (Harhaj *et al.* 2002). Recentemente, foi demonstrado em modelos animais que a calicreína plasmática pode contribuir para a disfunção vascular retiniana (Clermont *et al.* 2011). Contrariamente, os corticosteroides parecem estabilizar e restabelecer as propriedades da barreira, ao aumentar a expressão de proteínas das TJ (Antonetti *et al.* 2002; Felinski *et al.* 2008). As TJ são pois estruturas dinâmicas, pelo que a lesão associada à diabetes e a níveis elevados de VEGF poderá ser reversível (Klaassen *et al.* 2013).

### **Alteração e Morte Celular Microvascular**

As alterações vasculares endoteliais na diabetes têm sido alvo de intensa investigação (maioritariamente) animal, mas também humana. A hiperglicemia crónica parece ser o seu principal mecanismo desencadeador.

Na fase de RD pré-clínica, caracterizada por ausência de lesões na oftalmoscopia, têm sido observadas alterações através de métodos mais sensíveis ou no exame histológico. As alterações patológicas iniciais incluem proliferação endotelial e formação de MAs, no lado venoso da circulação, e morte de células endoteliais e aparecimento de áreas de não perfusão capilar (oclusão capilar), no lado arterial (Cunha-Vaz 1972; Lorenzi & Gerhardinger 2001).

A fase pré-clínica é também caracterizada pela perda de pericitos da parede vascular e espessamento da membrana basal (Lorenzi & Gerhardinger 2001; Kern & Engerman 1994). A angiografia fluoresceínica (AF) confirma os achados histopatológicos de forma dinâmica. Foi a primeira técnica a documentar o derrame de contraste através da parede dos vasos da retina, por ruptura da BHR (Cunha-Vaz & Maurice 1967). Adicionalmente, a AF também revela áreas de não perfusão capilar e a sua progressão, um importante indicador de aumento da isquemia da retina.

A lesão e morte dos pericitos, precoce e muito característica da RD (KUWABARA & COGAN 1963; Kern & Engerman 1994; Enge *et al.* 2002), tem uma distribuição irregular, mas muito difundida, e torna-se aparente por acumulação de material eosinófilo. Os pericitos têm propriedades contrácteis e estão rodeados pela membrana basal capilar (KUWABARA & COGAN 1963), estabilizam os capilares da retina e contribuem significativamente para a manutenção da BHR. Os pericitos sofrem morte *in situ* (Mizutani *et al.* 1996), por apoptose ou necrose (Feenstra *et al.* 2013), como consequência da hiperglicemia (Mizutani *et al.* 1996). A sua perda tem sido associada a alteração do diâmetro dos microvasos, formação de MAs, acelularidade vascular e retinopatia proliferativa (Enge *et al.* 2002).

A apoptose de células endoteliais, que poderá ocorrer antes da morte dos pericitos (Lutty 2013), tem sido associada ao *stress* oxidativo (Brownlee 2005; Hammes *et al.* 2011) e à aderência de leucócitos (Jousen *et al.* 2001). A célula endotelial morta é facilmente removida pelo fluxo sanguíneo e substituída por outra, enquanto os pericitos permanecem muito tempo na sua localização, e são mais facilmente identificados (Cunha-Vaz 1978).

A não perfusão capilar/perda das células capilares retinianas tem sido relacionada com pelo menos 3 processos patológicos: alterações pró-inflamatórias, microtrombose e apoptose (Gardner *et al.* 2000; Cunha-Vaz & Bernardes 2005). Efetivamente, quando surge a morte dos pericitos e das células endoteliais, o que fica são capilares acelulares, tubos colagenosos, sem fluxo sanguíneo (Kohner & Henkind 1970), e a



retina sensorial adjacente torna-se hipóxica. A hipóxia aumenta a produção de VEGF, com conseqüente aumento da permeabilidade vascular; aumenta a expressão de *intercelular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Lu *et al.* 1999), que promove a leucostase (Lutty 2013); e aumenta a proliferação de células endoteliais (D'Amore 1994). O aumento da permeabilidade ao fluido e proteínas leva a edema da retina.

Ao contrário dos pericitos, que não proliferam, a proliferação das células endoteliais dá origem, inicialmente, à formação de MAs e, por fim, à formação de neovascularização prerretiniana, a “marca” da retinopatia proliferativa. Na RD, os MAs, que ocorrem preferencialmente no polo posterior, no lado venoso da circulação, são a primeira alteração visível da RD (Porta 1996).

Outra das alterações iniciais característica da RD, comum a outros órgãos, nomeadamente o rim, é o espessamento da membrana basal dos capilares (Vlassara 1997; King & Brownlee 1996). Os mecanismos envolvidos nesta alteração não são exatamente conhecidos, tendo sido proposta a glicosilação não enzimática, a redução de proteoglicanos na membrana basal e o aumento de síntese proteica (Vlassara 1997; King & Brownlee 1996).

### **Disfunção e Apoptose Neuronal**

Para além das alterações vasculares, a retina neurosensorial está alterada na diabetes (Antonetti *et al.* 2012; Simó & Hernández 2014; Stem & Gardner 2013).

Em doentes diabéticos, sem lesões de RD detetadas na fundoscopia, foram observados defeitos subtis da função da retina neurosensorial (Daley *et al.* 1987; Della Sala *et al.* 1985), o que pode indicar que a disfunção da retina interna, e a alteração neuronal, poderia preceder a lesão vascular. No passado, há várias décadas atrás, JR Wolter documentou, em estudos *posmortem* de retinas de indivíduos diabéticos, a disfunção e perda neuronal, sendo os neurónios da retina interna os mais afetados (WOLTER 1961). Posteriormente, outros estudos confirmaram as observações de Wolter, mostrando que a apoptose neuronal é, também, uma marca da RD (Barber

*et al.* 1998; Park *et al.* 2003; Santiago *et al.* 2007; Zeng *et al.* 2000; Abu-El-Asrar *et al.* 2004). Em conformidade com estes achados, foram reportadas em doentes diabéticos alterações no eletrorretinograma (Uccioli *et al.* 1995), na sensibilidade ao contraste (Arend *et al.* 1997), e na visão cromática (Green *et al.* 1985). Estas alterações funcionais podem ser identificadas antes da deteção de lesões microvasculares na fundoscopia (Lopes de Faria *et al.* 2001), e demonstram que a disfunção e apoptose neuronal está presente precocemente na RD (Barber 2003). A apoptose de neurónios primariamente na camada de células ganglionares e na camada nuclear interna também foram descritas mais recentemente no processo da doença diabética na retina (Simó & Hernández 2014; Stem & Gardner 2013). Existem pois, múltiplas evidências, crescentes, que suportam a ideia de que a diabetes induz, para além das alterações microvasculares, uma neurodegeneração crónica na retina (Barber 2003; Barber *et al.* 2011).

A disfunção da retina interna pode afetar neurónios e células gliais e induzir alterações na unidade neurovascular e BHR antes de surgirem sinais óbvios de lesões vasculares (Antonetti *et al.* 2012). A neurodegeneração retiniana participa no desenvolvimento das alterações microvasculares precoces que ocorrem na RD, tais como rutura da BHR (Kusari *et al.* 2007; Liu *et al.* 2012; Silva *et al.* 2009), vasoregressão (Hammes *et al.* 2011) e perda da união neurovascular (Lecleire-Collet *et al.* 2011; Luu *et al.* 2010).

### **Células Gliais**

As células gliais que existem na retina são as células de Müller e os astrócitos, que também parecem estar disfuncionais na diabetes (Fletcher *et al.* 2007). As células de Müller, o principal tipo de células gliais da retina, ocupam a espessura da retina desde o EPR até à membrana limitante interna, e têm os corpos celulares na camada nuclear interna, são responsáveis pelo suporte estrutural e metabólico dos neurónios e vasos sanguíneos da retina, e são essenciais para a sua homeostasia (Bringmann *et al.* 2006). Controlam a composição do fluxo extracelular, ao mediar o transporte transcelular de iões, água e bicarbonato; dão suporte trófico e anti-oxidativo aos fotorreceptores e

neurónios; e regulam a expressão de proteínas das TJ, e a permeabilidade da BHR (Reichenbach & Bringmann 2013). Hammes *et al.* mostraram que na retina diabética existe, para além de apoptose de células microvasculares e neurónios, apoptose de células de Müller (Hammes *et al.* 1995). Alterações da onda b do eletrorretinograma, que têm origem também nas células de Müller, são evidência funcional da disfunção desta célula (Li *et al.* 2002).

Os astrócitos estão confinados à camada de fibras nervosas, onde os seus processos envolvem os vasos sanguíneos e as células ganglionares. Esta interação é importante para induzir a expressão de proteínas das TJ e manter a BHR (Gardner *et al.* 1997). Na diabetes, os astrócitos diminuem a expressão da proteína acídica fibrilar glial, o que sugere fortemente a sua disfunção (Gardner *et al.* 2002).

Conjuntamente, as células de Müller e os astrócitos integram a atividade neuronal e vascular na retina (Gardner *et al.* 2002). A alteração das células gliais parece contribuir para o aumento da permeabilidade da BHR (Barber *et al.* 2000), diretamente ou através de aumento do VEGF (Cervia *et al.* 2012; Mei *et al.* 2012; Shen *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2006), tendo sido recentemente reportada uma relação direta entre a alteração destas células, níveis aumentados de VEGF e a rutura da BHR (Shen *et al.* 2010).

Por outro lado, as células gliais regulam o metabolismo do glutamato (o principal neurotransmissor), e a atividade sináptica na retina interna (Newman & Reichenbach 1996; Reichenbach & Bringmann 2013; Bringmann *et al.* 2009). Na diabetes este processo está precocemente alterado, resultando em acumulação de excesso de glutamato, que se pode associar a excitotoxicidade e degeneração neuronal (Lieth *et al.* 1998; Gowda *et al.* 2011).

### **Microglia**

As células microgliais da retina podem ser de 2 tipos: com origem nas células hematopoiéticas ou derivadas do mesenquima do nervo ótico. Normalmente, estas

células estão quiescentes, mas em certas condições, como na diabetes, podem ficar ativadas (Zeng *et al.* 2000; Joussem *et al.* 2009), contribuindo para um papel relevante da inflamação na patogenia da RD.

Os mecanismos exatos pelos quais as citocinas inflamatórias são libertadas e contribuem para a apoptose neuronal e vascular permanecem mal elucidados (Ibrahim *et al.* 2011), mas poderão envolver a indução de excitotoxicidade, *stress* oxidativo ou disfunção mitocondrial (Barber *et al.* 2011).

### **Inflamação Crónica de Baixo Grau**

Existe evidência crescente que suporta o papel da inflamação na patogenia da RD (Blom *et al.* 2011; Joussem *et al.* 2004; Tang & Kern 2011). Uma situação de inflamação crónica “de baixo grau” tem sido associada às complicações vasculares (disfunção endotelial universal) que ocorrem na diabetes (Adamis 2002; Kern 2007; Noda *et al.* 2012).

A inflamação é uma resposta não específica do organismo à lesão tecidual, na qual os leucócitos, células grandes que podem gerar radicais livres e enzimas proteolíticas, são recrutados para o tecido inflamado.

Na diabetes foi demonstrado um aumento dos níveis sistémicos de citocinas inflamatórias (Gardner *et al.* 2002), como a Interleucina-1 $\beta$  e o *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* , e do número de leucócitos ativados (Lutty 2013). A leucostase, aderência e retenção de leucócitos nos microvasos da retina (Miyamoto *et al.* 1998; Noda *et al.* 2012), foi observada na retina de ratos diabéticos 2 semanas após indução de diabetes por estreptozocina (Nishiwaki *et al.* 1995), sensivelmente o mesmo período de tempo em que noutros estudos se observou derrame através da BHR interna (Joussem *et al.* 2001). Nas fases mais iniciais da RD parece haver, também, uma diminuição da deformabilidade dos leucócitos polimorfonucleares (Braun *et al.* 1996; Kim *et al.* 2005). A adesão dos leucócitos ao endotélio poderá resultar de um aumento dos níveis de ICAM-1, no endotélio, e da expressão de CD11/CD18, na superfície dos leucócitos

ativados (Lutty 2013; Joussem *et al.* 2002). Os PFGA, o VEGF e o ácido nítrico também poderão ter um papel na leucostase (Joussem *et al.* 2002).

A leucostase tem sido correlacionada com a diminuição do fluxo sanguíneo e estreitamento capilar, associados a aumento da endotelina, vasoconstritora (Lutty 2013), e com a oclusão capilar; com a lesão e morte da célula endotelial; e com a rutura da BHR, e aumento da permeabilidade vascular (Joussem *et al.* 2001; Joussem *et al.* 2002; Joussem *et al.* 2007).

Dados recentes indicam que o processo reparador da inflamação contribui para a progressão da RD, particularmente ao criar condições para o desenvolvimento das complicações que ameaçam a visão (Cunha-Vaz *et al.* 2014). O tratamento com agentes anti-inflamatórios, corticosteroides intra-vítreos, reduz o edema macular e pode prevenir a progressão para RDP ao restabelecer a BHR (Campochiaro *et al.* 2011).

### **Coagulação**

No decurso da DM ocorrem alterações da coagulação e aumento do número de trombos de plaquetas-fibrina nos capilares da retina (Boeri *et al.* 2001). Efetivamente, a não perfusão capilar, e eventual oclusão capilar, podem ser a consequência de microtrombozes retinianas (Gardner *et al.* 2000; Cunha-Vaz & Bernardes 2005). Foram documentadas alterações em todas as fases da coagulação, afetando a formação e inibição de trombos, a fibrinólise, as plaquetas e a função endotelial (Ceriello 1993; Boeri *et al.* 2001; Porta 1996). A hiperglicemia, provavelmente, determina o início destas alterações, através de 3 mecanismos: a glicosilação não enzimática, e alteração da função de moléculas da coagulação (Brownlee *et al.* 1984a); o aumento do *stress* oxidativo; e a diminuição dos níveis de sulfato de heparina, e consequente diminuição da defesa anti trombótica (Ceriello 1993).

**Em resumo**, a alteração inicial da BHR pode levar à migração de macrófagos para a retina neurosensorial ou aumento da aderência aos microvasos, bem como, acumulação de mediadores angiogénicos e inflamatórios na cavidade vítrea,

contribuindo para a formação de microtrombozes nos vasos da retina e oclusão capilar progressiva (Cunha-Vaz *et al.* 2014).

### **3.1.3. Alterações do Fluxo Sanguíneo da Retina**

A medição do fluxo sanguíneo na retina é tecnicamente um processo muito complexo, até à data não completamente resolvido. Foram identificadas grandes limitações nas técnicas usadas para medir o fluxo sanguíneo, que incluem sistemas de laser/doppler.

No entanto, apesar das limitações técnicas, têm sido identificadas certas alterações no fluxo sanguíneo da retina, em diferentes fases de progressão da RD, que dão algumas indicações úteis a propósito do comportamento dos vasos da retina na diabetes. Aparentemente, os parâmetros do fluxo sanguíneo estão alterados como resultado de alterações agudas e subagudas da glicemia (Bursell *et al.* 1996). Estas alterações podem contribuir para a lesão endotelial e estabelecer as condições, nomeadamente má-perfusão, que facilitam a formação de microtrombos (Boeri *et al.* 2001; Cunha-Vaz & Bernardes 2005).

Ludovico *et al.* mostraram que nem todos os olhos de indivíduos diabéticos, mesmo antes do desenvolvimento de lesões de RD, têm valores de fluxo sanguíneo na retina semelhantes (Ludovico *et al.* 2003). Assim, estes autores mostraram que alguns doentes apresentam diminuição do fluxo sanguíneo, enquanto outros têm valores significativamente aumentados de fluxo sanguíneo. Estas observações podem, efetivamente, explicar os vários relatos contraditórios que se observam na literatura. No entanto, na fase de RD não proliferativa (RDNP), parece existir consenso entre alguns autores, que reportaram, inicialmente, algum grau de aumento do fluxo sanguíneo na retina (Blair *et al.* 1982; Kohner *et al.* 1975; Cunha-Vaz, Fonseca & Abreu 1978). Mais tarde, com o aumento da isquemia e desenvolvimento de neovascularização, pode surgir a diminuição generalizada do fluxo sanguíneo na retina, embora nesta fase da doença retiniana os resultados obtidos com as técnicas que existem sejam ainda mais difíceis de interpretar.

Na diabetes ocorre, também, perda do mecanismo de autorregulação dos vasos da retina e dilatação (e alongamento) de arteríolas e vénulas (Cheung, Tikellis, *et al.* 2007; Gardiner *et al.* 2007).

A autorregulação é uma característica geral dos vasos sanguíneos do sistema nervoso central, que está também presente nos vasos da retina. Os vasos da retina não têm inervação sistêmica autonómica (Malmfors 1965), pelo que o mecanismo autorregulatório permite, dentro de certos limites, manter um fluxo sanguíneo relativamente constante, quando existem variações da pressão arterial, e manter a homeostasia da retina. Assim, em condições de hipoxia as arteríolas retinianas dilatam, para melhorar o suprimento sanguíneo, e em condições de hiperoxia, contraem. Na diabetes ocorre perda do mecanismo de autorregulação, e deterioração progressiva com o agravamento da RD (Sinclair *et al.* 1982). Os fatores locais primariamente responsáveis pela autorregulação vascular são o ácido nítrico e a endotelina-1 (Patel *et al.* 2008). No vítreo de doentes com EMD foi observada uma diminuição da concentração de endotelina-1 (Patel *et al.* 2008). A estreita união da unidade neurovascular na retina é também evidenciada pela autorregulação do fluxo sanguíneo vascular retiniano por níveis de metabolitos locais (como o ácido láctico, a pressão parcial de oxigénio e de dióxido de carbono) e pelas células gliais (Pournaras *et al.* 2008).

Em condições de hipoxia, como na RD, as arteríolas da retina dilatam, o que diminui a resistência, de que resulta aumento da pressão hidrostática nos capilares da retina (Stefánsson 2006). A dilatação das arteríolas pode aumentar a pressão hidrostática capilar e, pela lei de Starling, contribuir para o edema da retina, mas também, para o aparecimento de outras manifestações típicas da RD, como os MAs, por dilatação capilar, e as hemorragias, por rutura (Cheung, Tikellis, *et al.* 2007; Quigley 2007). Há evidência de que, à medida que o edema macular se desenvolve, os vasos sanguíneos da retina dilatam progressivamente (Kristinsson *et al.* 1997).

### 3.1.4. Alterações Funcionais

Nas fases precoces da RD, a AV não parece ser suficientemente sensível para detetar alteração da função retiniana. Frisén *et al.* encontraram evidência de que a AV permanece normal até cerca de 55% dos canais neurorretinianos estarem afetados (Frisén & Frisén 1976) e a zona avascular da fóvea está frequentemente aumentada em indivíduos diabéticos sem sinais de alteração da AV (Arden *et al.* 1986). Por outro lado, em doentes diabéticos com AV normal, alguns autores mostraram que a sensibilidade ao contraste está significativamente reduzida (Arend *et al.* 1997; Sokol *et al.* 1985). Alterações na visão cromática foram também detetadas antes do aparecimento clínico de lesões de RD (Green *et al.* 1985; Bresnick *et al.* 1985). Adicionalmente, a perimetria azul/amarelo mostrou perda da função macular, secundária a alterações vasculares retinianas, nas fases precoces da doença, sem alteração da AV (Remky *et al.* 2000; Han, Adams, *et al.* 2004). A alteração do eletrorretinograma, obtido em doentes diabéticos sem lesões de RD, aponta igualmente para uma disfunção neuronal precoce na RD (Uccioli *et al.* 1995).

Os potenciais oscilatórios, que se pensa que têm origem na camada plexiforme interna, por circuitos inibitórios que ligam as células amácrinas e ganglionares, são considerados bons indicadores da extensão da isquemia da retina. Nas fases iniciais da RD podem estar alterados (Bears, Han, Schneck, Barez, *et al.* 2004), e a alteração da sua amplitude foi associada ao risco de progressão de formas ligeiras de RD para formas avançadas de RDP (Bresnick *et al.* 1984).

O eletrorretinograma multifocal permite uma avaliação funcional topográfica, objetiva, da sensibilidade retiniana em múltiplas localizações no polo posterior. Alterações locais da amplitude e atrasos foram encontrados em doentes diabéticos com e sem lesões de RD (Fortune *et al.* 1999; Han, Bears, *et al.* 2004; Han, Adams, *et al.* 2004; Bears, Han, Schneck & Adams 2004). No eletrorretinograma multifocal, o tempo entre o estímulo e o pico da onda P1 (*implicit time*) foi espacialmente associado com a retinopatia, correlacionado com a gravidade da retinopatia (Bears *et al.* 2006),



e considerado um preditor do desenvolvimento de retinopatia após um período de um ano (Han, Bearse, *et al.* 2004; Han, Schneck, *et al.* 2004) e três anos (Ng *et al.* 2008).

Deve também ser notado que o componente P1 do eletrorretinograma multifocal é gerado primariamente pelas células bipolares (Hood *et al.* 2002), que se encontram na camada nuclear interna da retina. Então, os neurónios envolvidos no sinal que investigamos estão na mesma localização intrarretiniana que as células vasculares, implicadas nas lesões de RD que observamos clinicamente. Assim, este parâmetro é um candidato a biomarcador de alterações funcionais relacionadas com a neurodegeneração que ocorre nos olhos de doentes diabéticos (Simó & Hernández 2012). Um estudo clínico europeu, EUROCONDOR (ClínicalTrials.gov Identifier: NCT01726075), atualmente a decorrer, pretende avaliar o potencial papel do eletrorretinograma multifocal como preditor da progressão da RD.

Os resultados aqui apresentados apontam para uma disfunção neuronal da retina, e morte, como eventos precoces no decurso da doença sistémica. Aliás, a perda de AV que pode surgir na RD, em particular nas fases mais avançadas da doença retiniana, reflete a alteração da função neuronal (Gardner *et al.* 2002).

## **3.2. História Natural da RD**

De acordo com as características fenotípicas, a RD pode ser dividida em 3 fases, que incluem uma fase pré-clínica, a RD pré-clínica, uma fase de RDNP, e uma fase de RDP. As lesões de RD têm início no polo posterior do olho, na retina central, entre as arcadas vasculares temporais (Cunha-Vaz *et al.* 2014).

### **3.2.1. RD Pré-Clínica**

Na RD pré-clínica não são visíveis lesões no fundo ocular. Na DM tipo 1, em que a duração da diabetes é habitualmente bem conhecida, o intervalo entre o diagnóstico e o desenvolvimento de lesões retinianas foi estimado em cerca de 5 anos (Klein *et al.* 1984c). Na DM tipo 2 é mais difícil estabelecer com certeza este intervalo, estimando-se que, entre o início da diabetes e o seu diagnóstico ocorreram, em média, 7 anos

(Harris *et al.* 1992). Nesta fase, apesar da ausência de lesões visíveis no fundo ocular, foram demonstradas alterações celulares nos vasos da retina e alterações funcionais vasculares, como diminuição da velocidade dos leucócitos nos capilares perifoveais (Sander *et al.* 1994), aumento da permeabilidade da BHR interna (Cunha-Vaz *et al.* 1975; Krogsaa *et al.* 1987), aumento do fluxo sanguíneo da retina (Grunwald *et al.* 1996), e alteração da função da retina neurosensorial (Daley *et al.* 1987).

### **3.2.2. RD Não Proliferativa**

As fases iniciais da RDNP, ligeira/moderada, são caracterizadas pela presença de pontos vermelhos, que correspondem a MAs ou pequenas hemorragias intrarretinianas; sinais indiretos de aumento da permeabilidade vascular, como os exsudatos duros; e sinais de oclusão capilar, como os exsudatos moles. Posteriormente, surge a vasodilatação, edema da retina, anomalias microvasculares intrarretinianas, alterações das veias e arteríolas, traduzindo fases progressivamente mais graves da retinopatia.

Os achados oftalmoscópicos iniciais são as hemorragias e os MAs, observados como pontos vermelhos no polo posterior da retina. A formação de MAs tem sido associada a uma proliferação local de células endoteliais, perda de pericitos e alteração da membrana basal capilar (Cunha-Vaz 1978; Cunha-Vaz & Bernardes 2005). Nesta fase, a proliferação endotelial e os MAs parecem estar confinados ao lado venoso da circulação retiniana, enquanto a degeneração endotelial parece estar limitada aos capilares do lado arterial. Com a progressão da doença, ocorre perda celular e encerramento dos capilares do lado arterial; simultaneamente, o número de MAs aumenta e as áreas de oclusão capilar alargam (Cunha-Vaz *et al.* 2014).

Os MAs estão localizados predominantemente na camada nuclear interna, isto é, na rede capilar profunda da retina e, na AF, são hiperfluorescentes, demonstrando, frequentemente, alteração associada da BHR, evidenciada por derrame de contraste (Kohner & Henkind 1970). Mais tarde, com a oclusão capilar progressiva, os MAs podem encerrar, provavelmente por um fenómeno trombótico (Boeri *et al.* 2001), e

deixar de ser aparentes na AF, indicando agravamento da retinopatia (Cunha-Vaz 1992). A contagem de MAs tem sido sugerida como um marcador de remodelação vascular retiniana e progressão da RD (Klein, Klein, *et al.* 1995; Klein, Meuer, *et al.* 1995; Lobo *et al.* 2004; Cunha-Vaz *et al.* 2014).

O RetmarkerDR (Critical Health SA, Coimbra, Portugal) é um *software* recentemente desenvolvido (Bernardes *et al.* 2009; Nunes *et al.* 2009) que permite a deteção automática de MAs no campo 2 (campo centrado na mácula) das fotografias a cores do fundo ocular. Com este sistema é possível identificar, em fotografias do fundo ocular sucessivas, de forma não invasiva, a localização exata de cada “ponto vermelho”, e calcular de forma automática as taxas de formação e desaparecimento de MAs, isto é, o seu *turnover*. A identificação da localização exata de cada ponto vermelho é importante, pois novos MAs desenvolvem-se apenas uma vez numa localização específica, e o seu desaparecimento deixa no seu lugar remanescentes da membrana basal (Cunha-Vaz 1978; Ashton 1974). O *turnover* de MAs é um processo dinâmico ao longo do tempo e pode ser representado pela formação de novos MAs num determinado período de tempo (Haritoglou *et al.* 2014; Nunes *et al.* 2009), ou pela formação e desaparecimento de MAs (Ribeiro *et al.* 2013). Figuras 1 e 2



Figura 1. Marcação automática de microaneurismas (MAs) com o RetmarkerDR (Critical Health SA, Coimbra, Portugal).

Marcação de MAs ao longo do tempo. Os microaneurismas são representados com um código de cores: verde para MAs antigos, vermelho para MAs novos, e amarelo para identificar MAs que desapareceram.

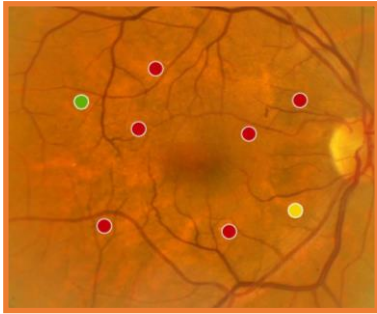


Figura 2. Marcação de MAs numa fotografia a cores do fundo ocular.

Recentemente, em doentes com DM tipo 2 e lesões de RDNP ligeira (N = 410), foi possível identificar 3 fenótipos diferentes, com diferentes riscos de progressão para EMCS, com base em parâmetros obtidos de forma não invasiva, a contagem de MAs e o *turnover* de MAs, calculados automaticamente pelo RetmarkerDR (Critical Health SA, Coimbra, Portugal) nas fotografias do fundo ocular, e os valores de espessura da retina, obtidos com o OCT (média da espessura da retina macular central - área com 1500  $\mu\text{m}^2$ , área macular com aumento da espessura e aumento máximo da espessura da retina) (Nunes *et al.* 2013). A análise de *cluster* pelo método matemático de Ward's confirmou a existência de três *clusters*. Os 3 fenótipos, A, B e C, resultaram de diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros de MAs e a espessura da retina, obtidos de forma não invasiva. O fenótipo A (representou aproximadamente 50% dos doentes) caracteriza-se por um *turnover* baixo de MAs e uma espessura da retina normal, e parece representar olhos com doença retiniana lentamente progressiva. O fenótipo B (representou aproximadamente 20% dos doentes) caracteriza-se por espessura da retina na área macular central aumentada, indicando uma alteração importante da BHR e a presença de edema focal; este grupo foi identificado como a forma exsudativa da RD. O fenótipo C (representou aproximadamente 30% dos doentes) caracteriza-se por aumento dos parâmetros associados aos MAs (número e *turnover*), demonstrando remodelação ativa da microcirculação retiniana (Nunes *et al.* 2013). Os resultados deste estudo confirmaram as observações prévias, num grupo menor de doentes, usando uma metodologia imagiológica multimodal elaborada (Lobo *et al.* 2004).

O desenvolvimento de EMCS ocorreu durante o período de seguimento de 2 anos do estudo mais frequentemente em doentes classificados nos fenótipos B e C, com maior incidência no fenótipo C (Ribeiro *et al.* 2013).

O *turnover* de MAs, calculado automaticamente de forma não invasiva nas fotografias a cores do fundo ocular, poderá ser usado como biomarcador prognóstico para identificar olhos/doentes em risco de progressão da RD para EMCS (Nunes *et al.* 2009; Ribeiro *et al.* 2013), a complicação da RD que ameaça a visão mais frequente. Independentemente, usando também o RetmarkerDR, Haritoglou *et al.* confirmaram estes resultados (Haritoglou *et al.* 2014).

Os resultados deste estudo indicam que uma grande proporção de olhos com RDNP ligeira progredirão muito lentamente, sugerindo que não devem ser incluídos em ensaios clínicos dada a sua baixa taxa de progressão. Sugere ainda que o seguimento dos doentes deveria ser recomendado em função dos diferentes fenótipos. A identificação destes fenótipos, caracterizados por alterações retinianas dominantes diferentes, e riscos diferentes de progressão para EMCS, abre novas perspectivas para uma conduta personalizada da RD, embora, presentemente, se desconheça se serão também preditivos da progressão para retinopatia proliferativa (Cunha-Vaz *et al.* 2014).

As hemorragias intrarretinianas resultam da rutura de pequenos vasos e MAs e são caracteristicamente mais numerosas no polo posterior. Os exsudatos duros são acumulações extracelulares de lípidos, proteínas e lipoproteínas provenientes de vasos anómalos, com derrame. Estes depósitos amarelos têm dimensões variáveis, podendo tornar-se confluentes e cobrir uma área grande no polo posterior. A oclusão capilar é uma característica importante da lesão vascular, e aumenta com a progressão da doença.

O edema da retina é definido como um aumento da espessura da retina na área macular central por acumulação de fluido, consequência da rutura da BHR e derrame de constituintes plasmáticos. Associa-se frequentemente a perda de AV, e é

evidenciado pelo derrame de contraste na AF e aumento da espessura da retina, quantitativamente avaliado pelo OCT. Em indivíduos diabéticos, o OCT tem permitido a deteção de edema macular subclínico (Pires, Santos, Nunes, Lobo, *et al.* 2013).

O aumento da permeabilidade da BHR pode ser identificado pela fluorofotometria do vítreo ou pela AF.

A fluorofotometria do vítreo é um método quantitativo para o estudo da permeabilidade da BHR, introduzido por Cunha-Vaz *et al.* em 1975 (Cunha-Vaz *et al.* 1975). Este método permitia detetar alterações mínimas na BHR, ao determinar gradientes de concentração entre a fluoresceína presente no sangue e a fluoresceína que penetrou no olho (no vítreo e no humor aquoso), e monitorizar a sua evolução temporal. A alteração da BHR interna, evidenciada através deste método, foi observada antes da deteção de MAs e de áreas de oclusão capilar na AF (Cunha-Vaz *et al.* 1975). Por outro lado, um estudo prospetivo de 7 anos de duração, que incluiu 40 indivíduos com DM tipo 2 e lesões de RDNP ligeira, mostrou que valores iniciais elevados de fluorofotometria do vítreo, bem como, o seu aumento durante o período do estudo, foram bons indicadores da progressão e agravamento da RD na DM tipo 2 (Cunha-Vaz *et al.* 1998), confirmando observações prévias de outros autores na diabetes tipo 1 (Engler *et al.* 1991). Também foi observada uma relação entre a rutura da BHR, presente na fluorofotometria do vítreo, e o controlo metabólico (Cunha-Vaz, Fonseca, Abreu, *et al.* 1978; Cunha-Vaz *et al.* 1979). Em resumo, em indivíduos diabéticos, a fluorofotometria do vítreo permitiu detetar precocemente a alteração da BHR, e esta alteração correlacionou-se com a progressão e agravamento da retinopatia, na diabetes tipo 1 e tipo 2, e com o mau controlo metabólico. Atualmente, este método foi substituído pelo OCT, um procedimento não invasivo.

A AF permite evidenciar, não apenas as áreas de alteração da BHR, com derrame perivascular de contraste, mas também áreas de oclusão capilar/não perfusão capilar, hipofluorescentes, que se podem estender à zona foveal, com resultante alargamento da zona avascular da fóvea.

Mais recentemente, Lobo *et al.* desenvolveram o Retinal Leakage Analyzer (RLA), um *scanning laser ophthalmoscope*, modificado para realizar medições de fluorescência (C. L. Lobo *et al.* 1999). Este método mede alterações localizadas da permeabilidade da BHR interna, evidenciadas pelo derrame de contraste (*leaking sites*), enquanto simultaneamente faz um mapeamento da retina. Este instrumento baseia-se num sistema confocal de *scanning laser ophthalmoscope* protótipo da Zeiss, modificado. As múltiplas medições de derrame de fluoresceína efetuadas na área macular com o RLA permitem construir mapas que representam a distribuição das alterações focais da BHR no polo posterior.

A RDNP grave é uma fase mais avançada da doença retiniana, e associa-se a aumento do risco de progressão para a forma proliferativa, que ameaça a visão. É caracterizada pela presença de exsudatos moles, anomalias do calibre venoso, anomalias microvasculares intrarretinianas e aumento das áreas de não perfusão capilar.

Na fase de RDNP a visão pode estar afetada por dois mecanismos: grau variável de oclusão capilar e consequente isquemia macular, e aumento da permeabilidade vascular da retina e resultante edema macular.

### **3.2.3. RD Proliferativa**

A RDP é caracterizada pela neovascularização da retina (angiogénese), proliferação fibrosa e hemorragia do vítreo. Os neovasos surgem no disco ótico ou na retina, tipicamente na junção entre a retina perfundida e não perfundida, e crescem em direção à superfície posterior do vítreo (Antonetti *et al.* 2012). Os neovasos têm junções permeáveis entre as células endoteliais, demonstrando uma BHR anómala, resultando no derrame de contraste característico na AF. A causa exata da formação dos neovasos não é conhecida, embora sejam sempre secundários à presença de grandes áreas de não perfusão capilar (Cunha-Vaz *et al.* 2014). Na sua génese poderão estar envolvidos fenómenos de angiogénese, seguidos de fibrose e eventual substituição dos tecidos vasculares por colagénio. Se não tratados, os neovasos levam

a contração do vítreo, hemorragia do vítreo (causa frequente de perda súbita de AV nos diabéticos) e descolamento tracional da retina.

Os fatores que têm sido implicados na patogenia da neovascularização incluem a hormona do crescimento, o fator 1 de crescimento *insulina-like*, o fator básico de crescimento dos fibroblastos e o VEGF (Aiello *et al.* 1994). O VEGF é um potente fator de crescimento que promove a angiogénese (Senger *et al.* 1993), produzido pelas células da retina neurosensorial e que atua em recetores da superfície das células endoteliais. O seu nível está elevado no vítreo de olhos com neovascularização e diminui após fotocoagulação panretiniana da retina (Aiello *et al.* 1994). A RDP responde bem à fotocoagulação, mas é essencial o tratamento precoce, antes do desenvolvimento de complicações associadas a tração.

Em resumo, as anomalias clinicamente observadas no fundo ocular na RD podem ser divididas em 3 categorias, que incluem os achados resultantes de anomalias microvasculares (hemorragias, exsudatos lipídicos, edema da retina); achados que resultam de lesão estrutural da parede vascular (MAs); e os achados que resultam de isquemia e subsequente aumento da produção de VEGF (exsudatos moles, anomalias microvasculares intrarretinianas, neovascularização pré-retiniana, proliferação fibrosa e hemorragia do vítreo) (Cunha-Vaz *et al.* 2014).

### **3.3. Rastreio da RD**

Na prática clínica, o método padronizado para deteção da RD, e necessidade de tratamento, consiste na realização de um exame oftalmológico, e observação do fundo ocular sob midríase pupilar, por um oftalmologista. No entanto, a questão do rastreio surge porque muitos diabéticos (demasiados) não realizam este tipo de exame de uma forma regular. O principal objetivo dos programas de rastreio da RD consiste na deteção precoce das lesões de RD que ameaçam a visão e referência do doente para um oftalmologista, que irá avaliar o nível de RD e decidir o tratamento indicado, e assim tentar reduzir a incidência da perda de AV associada à diabetes.



Em geral, o rastreamento de uma doença é justificado quando se trata de uma condição com importância para a saúde pública, para a qual existe tratamento eficaz, e um intervalo definido no qual o tratamento pode ter benefício, e se trata de uma situação que não é nem muito comum nem muito rara (Jekel JF *et al.* 1996). O rastreamento de DM em indivíduos com mais de 40 anos e o rastreamento de RD em indivíduos com diagnóstico de DM preenchem estes critérios (Leiter *et al.* 2001; Kuo *et al.* 2005). Por outro lado, o tratamento da DM e da RD é rentável (DCCT 1996; Lin *et al.* 2002; Tung *et al.* 2008).

A importância do rastreamento da RD tornou-se amplamente reconhecido, embora o melhor método de rastreamento e os intervalos entre as observações tenham sido alvo de debate e um assunto controverso (Vijan *et al.* 2000).

A Academia Americana de Oftalmologia recomenda a observação do fundo ocular sob midríase pupilar, através de oftalmoscopia direta e indireta, anualmente, após o diagnóstico de DM tipo 2, e anualmente após 5 anos do diagnóstico, na DM tipo 1; nas grávidas recomenda uma avaliação no primeiro trimestre, e um seguimento posterior apertado se existirem sinais de retinopatia que ameaçam a visão (Chew *et al.* 2003). No entanto, dependendo dos países, 30 a 50% dos diabéticos não são observados anualmente, e entre 10 a 36% nunca realizaram exame do fundo do olho sob midríase (Vijan *et al.* 2000; Boucher *et al.* 2005; Raman *et al.* 2009; McKay *et al.* 2000; Roy 2004; Moss *et al.* 1995; Wang & Javitt 1996; Bresnick *et al.* 1984; Bresnick *et al.* 2000). A falha do rastreamento parece estar mais frequentemente relacionada com fatores de natureza econômica, associada à pobreza, e a minorias com acesso limitado aos cuidados primários de saúde (Roy 2004; Wang & Javitt 1996; Wong & Wang 2006; Xie *et al.* 2008; Farley *et al.* 2008). Outras razões, para além da pobreza, incluem um número e/ou distribuição desajustada dos oftalmologistas, não referência por médicos de outras especialidades, não conscientização da importância do exame oftalmológico regular em diabéticos, idades avançadas, necessidade de realizar midríase pupilar e a diabetes não diagnosticada (Kuo *et al.* 2005; Deb-Joardar *et al.* 2005; Boucher *et al.* 2008; Will *et al.* 1994). Efetivamente, o rastreamento da RD implica a

necessidade de rastreio de DM; se a DM não estiver diagnosticada, não existe possibilidade de rastreio de RD.

Existe uma correlação entre a ausência de rastreio de DM e RD e uma proporção evitável de olhos com cegueira (Klein 1997). Em países com programas estabelecidos de rastreio de RD, a incidência e prevalência de casos de cegueira relacionados com a diabetes tem diminuído (Arora *et al.* 2012), e parece ser menor do que em países que não têm rastreio (Stefánsson *et al.* 2000). Num estudo numa população de Bristol, no Reino Unido, 5.5% dos casos de cegueira detetados foram atribuídos à RD; destes, 50% nunca tinham realizado exame oftalmológico, e 22% desconheciam que eram diabéticos (Clark *et al.* 1994).

As técnicas ótimas para rastreio de EMD, RDNP e RDP podem variar, pois a deteção do EMD, que requer estereopsia, e da RDP, com lesões mais periféricas, podem ser comprometidas pelos métodos usados (Liesenfeld *et al.* 2000; Boucher *et al.* 2008; Klein *et al.* 1985; Barrie & MacCuish 1986). Assim, por exemplo na DM tipo 1, alguns estudos preconizaram protocolos mais complexos para o rastreio oftalmológico, dada a maior probabilidade de existir neovascularização retiniana (Will *et al.* 1994).

A eficácia de um programa de rastreio depende da prevalência da doença; da aderência da população alvo (*compliance*); da sensibilidade, que deve ser superior a 80% (Liesenfeld *et al.* 2000), e especificidade do método de rastreio usado para deteção da RD; e do custo (James *et al.* 2000).

Os testes de avaliação da AV, realizados por médicos não oftalmologistas, são claramente insuficientes para a deteção da RD (Nathan *et al.* 1991; Stellingwerf *et al.* 2004; Scanlon *et al.* 2008; Anderson *et al.* 2003); a oftalmoscopia direta, sem midríase, realizada por médicos não oftalmologistas, é dependente da experiência, e tem uma sensibilidade baixa e muito variável (Bresnick *et al.* 2000; Nathan *et al.* 1991).

Presentemente, existem duas opções principais para realizar o rastreio da RD, que são a oftalmoscopia e a fotografia do fundo ocular.

A oftalmoscopia sob midríase pupilar tem mostrado boa sensibilidade e especificidade para deteção de RD (Swanson 2005; Kleinstein *et al.* 1987; Davies *et al.* 1996; Nathan *et al.* 1991; Emanuele, Klein, *et al.* 2009). No entanto, a maioria dos estudos, embora nem todos, têm mostrado que, na deteção das lesões de RD, a oftalmoscopia sob midríase é inferior à fotografia a cores do fundo ocular de um campo, mesmo não midriática (Lin *et al.* 2002; Williams *et al.* 2004; Williams *et al.* 1986). Saliente-se, porém, que a oftalmoscopia/exame oftalmológico pode ter algumas vantagens para o doente, que não ocorrem com o rastreio fotográfico.

O rastreio fotográfico da RD tem incluído múltiplas estratégias de aquisição das imagens, no que diz respeito à necessidade de midríase pupilar (Deb-Joardar *et al.* 2005; Peto & Tadros 2012), aquisição de um (Perrier *et al.* 2003; Klein *et al.* 1985; Williams *et al.* 1986) ou mais campos da retina (Peto & Tadros 2012; Oliveira *et al.* 2011), e graus captados por campo (30, 40, 60), e são dificilmente comparáveis, do ponto de vista técnico (Kuo *et al.* 2005; Liesenfeld *et al.* 2000; Boucher *et al.* 2005; Farley *et al.* 2008; Deb-Joardar *et al.* 2005; Boucher *et al.* 2008; Stellingwerf *et al.* 2004; Anderson *et al.* 2003; Harding *et al.* 1995). O método padronizado para deteção fotográfica da RD é o protocolo de aquisição dos sete campos da retina, com estereopsia, abrangendo uma área de 65 – 75 graus do fundo ocular. Este método é, no entanto, caro, incómodo para o doente, e (quase) impraticável em termos de rastreio, pelo que se reserva para protocolos de estudos clínicos (Kuo *et al.* 2005; Lin *et al.* 2002; Klein *et al.* 1985; Stellingwerf *et al.* 2004).

Os rastreios fotográficos podem ser implementados em instalações “provisórias”, como as unidades de cuidados de enfermagem, clínicas de endocrinologia, centros de saúde, unidades móveis. A notificação da população alvo adquire, nestas circunstâncias, uma importância primordial (Will *et al.* 1994; Peto & Tadros 2012).

Os critérios para referenciação para observação por um oftalmologista variam na literatura. Para alguns, a presença de qualquer nível de RD mais grave do que a

presença de MAs apenas é critério de referência (Lin *et al.* 2002), enquanto outros colocam a fasquia num nível de RD um pouco mais grave (Boucher *et al.* 2008).

No que diz respeito ao intervalo entre rastreios, a maioria dos programas implementados varia entre anual (Peto & Tadros 2012) a bianual (Scanlon *et al.* 2005).

O rastreio da RD é rentável na DM tipo 1 e tipo 2 (Maberley *et al.* 2003; Javitt *et al.* 1994; Javitt & Aiello 1996), mas em particular na DM tipo 1, devido à alta incidência de formas avançadas da doença, mas também, pela maior sobrevivência destes indivíduos (Nathan *et al.* 1991).

O Programa de Rastreio da RD na região centro de Portugal (ARS - Centro) tem sido implementado, anualmente, em centros de saúde em 6 distritos da região centro de Portugal. O protocolo deste programa consiste na aquisição, com uma câmara de fundo ocular, de 2 fotografias a cores do fundo ocular a 45º, 4 imagens por doente, sem midríase pupilar. As fotografias são tiradas com a seguinte ordem: olho direito e olho esquerdo; primeira fotografia centrada na área macular (campo 2), segunda fotografia sobre o disco ótico e retina nasal (campo 1). As imagens são guardadas em ficheiros jpeg., com uma resolução de 768-584 pixéis (Oliveira *et al.* 2011), e depois enviadas para o centro de leitura da imagem da AIBILI, responsável pela sua classificação. Figura 3

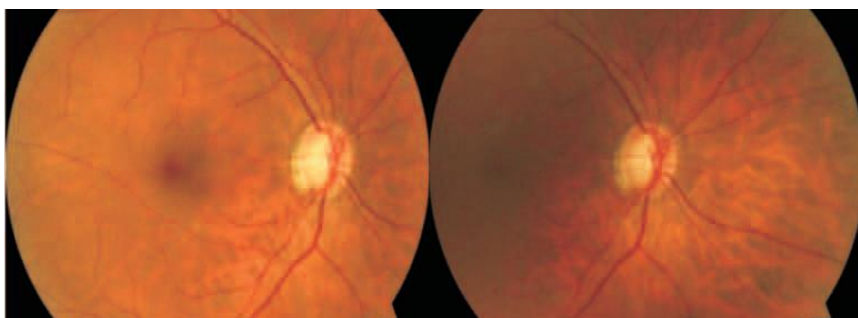


Figura 3. Fotografias a cores do fundo ocular adquiridas durante o rastreio de RD.

Fotografia do campo 2 (área macular), à esquerda, e à direita fotografia do campo 1 (sobre o disco ótico e retina nasal).

Desde 2011 todas as imagens recebidas no centro são analisadas, numa primeira fase, pelo RetmarkerDR (Critical Health SA, Coimbra, Portugal). Este *software*/sistema

identifica os sinais de RD ao detetar automaticamente lesões puntiformes vermelhas, ou seja, MAs e hemorragias, e assim separa as imagens que requerem classificação humana das que não requerem. A classificação humana subsequente é realizada em todas as imagens nas quais foram identificados sinais de RD, em pelo menos um olho, e sempre que o RetmarkerDR falha o processamento da imagem; uma percentagem de casos (cerca de 25%) classificados como não requerendo classificação humana também são encaminhados para a classificação humana, num processo *blind*, para testar a eficácia do sistema; todas as imagens que têm comentários do técnico/fotógrafo também são enviadas para a classificação humana, independentemente do resultado da análise automática. Este procedimento adiciona segurança adicional ao programa.

A classificação manual/humana é realizada por um *grader* qualificado pertencente à equipa do projeto, que classifica as imagens em “classificável” e “não classificável”; se “não classificável” deve ser repetido, logo que possível, o procedimento. Quando as imagens são classificáveis, o *grader* utiliza a seguinte escala de classificação: “R0” – ausência de retinopatia; “R1” – presença de lesões de RDNP (MAs, hemorragias intrarretinianas ou exsudatos duros não classificáveis no nível seguinte); ambos casos, “R0” e “R1” são referenciados para rastreio no ano seguinte e a equipa de prestação de cuidados é informada do resultado do rastreio. As imagens podem ainda ser classificadas em “M” – presença de maculopatia, pela observação de exsudatos numa área a um disco de diâmetro do centro da fóvea, MAs e/ou hemorragias numa área a um disco de diâmetro do centro da fóvea e/ou hemorragias profundas múltiplas, redondas ou em mancha, e anomalias venosas grandes; “RP” – quando se observam lesões de RDP, ou seja, neovasos no disco, neovasos na retina, hemorragia do vítreo ou pré retiniana, ou fibrose pré retiniana com descolamento tracional da retina. As classificações em “M” e “RP” originam referência a consulta de diabetes ocular para tratamento, urgente (2 a 4 semanas) se “RP”. A classificação humana é sujeita a um controlo de qualidade periódico. Alguns casos são aleatoriamente selecionados e classificados por outro *grader*, sem conhecimento dos resultados do primeiro *grader*, e os resultados comparados. A percentagem de concordância tem em consideração a concordância/não concordância nos níveis “M” e “RP”, que requerem referência,

por um coordenador do projeto/*adjudicator grader*, e deve ser  $\geq 80\%$ ; casos de não concordância serão discutidos em reuniões.

A escala de classificação utilizada no centro de classificação da AIBILI difere ligeiramente da escala utilizada no âmbito do programa de rastreio de RD e do EMD implementado no Reino Unido, que compreende mais níveis de classificação, ao todo 8 (níveis R0, R1, R2, R3, M0, M1, P e OL/UG) (Peto & Tadros 2012). Porém, o principal objetivo de um programa de rastreio de RD é a referência dos doentes com sinais de patologia tratável, ou seja, maculopatia ou RDP, para uma consulta de oftalmologia. Casos com RDNP, ainda que moderada/grave, não são tratáveis e, portanto, não devem ser referenciados para tratamento. A escala de classificação implementada no centro de classificação da AIBILI baseia-se nestes princípios.

Os programas de rastreio da RD, apesar de rentáveis em termos de economia da saúde (Maberley *et al.* 2003), são, no entanto, caros, representando um investimento substancial em tempo, esforço, equipamento e recursos humanos (Peto & Tadros 2012). A classificação das imagens representa um dos “pesos” nos rastreios. A introdução de métodos automáticos/semiautomáticos como primeiro passo na classificação das imagens fotográficas parece reduzir eficazmente o volume de imagens para classificação humana, melhorando por isso a sua eficácia, como se tem constatado no âmbito do rastreio da RD implementado na região centro de Portugal com a introdução do RetmarkerDR, e de acordo com as observações de outros autores (Goatman *et al.* 2011).

Os protocolos de rastreio da RD têm evoluído e novas metodologias imagiológicas têm sido sugeridas e poderão vir a ser implementadas. Por exemplo, no futuro, poderão vir a ser usados novos tipos de câmaras de fundo ocular, nomeadamente as câmaras de campo amplo. Mais recentemente, alguns autores têm sugerido a utilidade da introdução do OCT nos protocolos de rastreio, em adição à fotografia a cores do fundo ocular, para melhorar a eficácia da deteção da maculopatia diabética com indicação para referência para um oftalmologista (Mackenzie *et al.* 2011; Virgili *et*

*al.* 2007). No entanto, a introdução de novas metodologias, para além de aumentar o número de imagens para classificação, implica uma maior complexidade do processo e requer treino e certificação adicional (Peto & Tadros 2012).

Em doentes diabéticos, a perda de AV tem um impacto negativo, do ponto de vista do bem-estar físico, emocional e social, e associa-se a menor qualidade de vida. O rastreio da RD, e a identificação das lesões que ameaçam a visão, maculopatia e RDP, associadas a referenciação e tratamento adequado, contribui definitivamente para manter uma boa qualidade de vida (Ahola *et al.* 2010; Davidov *et al.* 2009; Gabrielian *et al.* 2010; Hariprasad *et al.* 2008).

Por fim, deve ser salientado que o rastreio é implementado para “captar” doentes diabéticos que não são regularmente observados na consulta de oftalmologia, por motivos diversos. A existência de um rastreio de RD não deve nunca ser interpretado como um substituto do exame oftalmológico sob midríase pupilar realizado por um oftalmologista, absolutamente recomendado na vigilância de todos os doentes diabéticos.





## Capítulo II



## 4. Edema Macular Diabético

O EMD, ou maculopatia diabética, é a causa mais frequente de perda de visão central em doentes com diabetes (ETDRS 1985; Aiello *et al.* 1998; Moss *et al.* 1988; Klein, Klein, *et al.* 1995; Klein *et al.* 1992; Mohamed *et al.* 2007; Antonetti *et al.* 2012), em particular nos indivíduos com diabetes tipo 2. Surge em todas as fases da RD, não proliferativa ligeira, moderada ou grave, ou em formas mais avançadas da RD (Klein & Klein 2003), embora a sua prevalência aumente com a gravidade da RD (Emanuele, Moritz, *et al.* 2009; Browning, Fraser & Clark 2008).

Em 2012, foi estimado que o EMD afeta aproximadamente 7% de todos os doentes com diabetes, cerca de 21 milhões de casos em todo o mundo (Ding & Wong 2012; Yau *et al.* 2012). Ding *et al.* estimaram que a prevalência do EMD é, na diabetes tipo 1, de 14%, e na diabetes tipo 2 de 6% (Ding & Wong 2012), embora estas percentagens correspondam a um número muito maior de indivíduos do tipo 2, dada a maior proporção.

Edema macular define-se clinicamente como uma acumulação de fluido no tecido retiniano de que resulta um aumento do seu volume, isto é, espessura (Cunha-Vaz & Travassos 1984); o aumento da espessura da retina é evidenciado no OCT, e a AF mostra derrame de contraste. O edema é, fundamentalmente, uma resposta inespecífica a uma grande variedade de agressões, que causam rutura da BHR interna ou externa, podendo surgir na patologia vascular da retina, nomeadamente na diabetes, associado a membrana epirretiniana, patologia inflamatória, tração vitreomacular, ou no pós-operatório (Marmor 1999; Tranos *et al.* 2004).

A RD progride durante muitos anos sem alteração da AV, pelo que a sua determinação tem um valor muito limitado na caracterização das fases iniciais da doença, que podem claramente beneficiar da implementação de medidas sobre fatores de risco modificáveis, que incluem um tratamento sistémico mais intensivo, melhor controlo dos níveis de pressão arterial e dos lípidos séricos, e a alteração do estilo de vida. A atuação precoce, evitando as complicações da RD, o EMCS e a RDP, e a

perda visual grave associada, é a estratégia que se deve adotar para preservar a visão. Tal só será possível através do uso de métodos de diagnóstico sensíveis e do conhecimento de biomarcadores de risco associados à progressão da doença, se possível de forma individual. A investigação de novas estratégias terapêuticas deve ter como alvo, também, as fases mais iniciais da doença, potencialmente reversíveis, e o doente.

Com o aparecimento de novos métodos de avaliação/medição objetiva da espessura da retina passou a ser possível detetar o EMD numa fase subclínica, ou seja, antes de se tornar clinicamente significativo.

#### **4.1. Epidemiologia**

Os estudos clínicos de larga escala ETDRS e WESDR permitiram uma compreensão da história natural, fatores de risco e efeitos do tratamento na RD e no EMD. No ETDRS a história natural de olhos com EMD mostrou que cerca de 24% perdem pelo menos 3 linhas de visão após 3 anos (ETDRS 1985).

O WESDR reportou uma incidência do EMD, aos 10 anos, entre 13,9 e 25,4% (Klein, Klein, *et al.* 1995). Contudo, provavelmente como consequência de um melhor controlo glicémico, a incidência anual do EMD tem diminuído (Klein *et al.* 2009).

Quanto à prevalência, apesar de estar a aumentar em todo o mundo, parece variar com a localização geográfica, tendo sido reportados valores que se situam entre 2.7% e 15% (Xie *et al.* 2008; Rubino *et al.* 2007; Wong *et al.* 2006; Varma *et al.* 2004; Petrella *et al.* 2012), e parece estar dependente, também, do tipo de diabetes e da duração da doença sistémica (Klein *et al.* 1984c).

Na DM tipo 1 o EMD pode surgir após cerca de 5 a 7 anos de doença, e depois a sua prevalência aumenta gradualmente, até atingir cerca de 30 a 40% dos doentes, quando decorridos 30 anos de doença (Vitale *et al.* 1995). Na DM tipo 2, 3 a 5% dos doentes têm EMD na altura do diagnóstico, presumivelmente porque a doença

metabólica não foi diagnosticada *ab initio*, e decorreram alguns anos. Depois, a prevalência aumenta, atingindo um patamar de aproximadamente 30% após 25 a 30 anos de diabetes (Klein *et al.* 1984c). Em geral, neste grupo de diabéticos, a prevalência é maior nos que requerem medicação com insulina.

Nos estudos epidemiológicos, o EMD foi associado a certos fatores sistêmicos (Varma *et al.* 2004; Klein *et al.* 1984c). Na DM tipo 1 os fatores associados foram a maior duração da doença sistêmica, proteinúria, uso de diuréticos e níveis elevados de HbA1c. Na DM tipo 2 os fatores associados foram a duração longa da diabetes, hipertensão arterial sistólica e aumento da HbA1c. A proteinúria foi um fator de risco no grupo da DM tipo 2 medicado com insulina. Os níveis séricos de colesterol parecem estar associados à gravidade da RD e dos exsudatos duros na DM tipo 2, mas não no tipo 1 (Klein *et al.* 1991).

O principal fator ocular associado com o desenvolvimento de EMD e EMD subclínico é a gravidade da RD. Embora o EMD possa ocorrer em todos os níveis de RD, o aumento da gravidade da RD subjacente está associado com o aumento da prevalência do EMD clínico e subclínico (Mohamed *et al.* 2007; Klein *et al.* 2009; Lattanzio *et al.* 2002; Browning *et al.* 2007; Klein *et al.* 1998). A incidência de EMD aos 14 anos aumenta de 25 para 37%, quando o nível de RDNP aumenta de ligeiro para moderado (Klein *et al.* 1998). Browning *et al.* estimaram uma prevalência de EMD subclínico de cerca de 4%, na RDNP ligeira/moderada, e de cerca de 15%, na RDNP grave/RDP (Browning, Fraser & Clark 2008).

Para além do efeito sobre os indivíduos afetados, o EMD tem custos económicos associados enormes, relativos à metodologia imagiológica usada para diagnóstico, nomeadamente o OCT, e o tratamento, onde se inclui o uso decrescente do laser e crescente da administração intra-vítrea de fármacos anti-VEGF (Shea *et al.* 2008).

## **4.2. Fatores de Risco**

### **4.2.1. Controlo Glicémico**

O fator de risco para o desenvolvimento do EMD melhor conhecido é a hiperglicemia crónica, normalmente superior a 120 mg/dL. Associadamente, o WESDR e o EDIC reportaram um aumento da incidência do EMD com a maior duração da doença sistémica (Klein, Klein, *et al.* 1995; White *et al.* 2010; Barr 2001).

A HbA1c é um dos mais importantes marcadores do controlo glicémico, sendo representativa do valor médio da glicose plasmática nos 3 meses prévios. O WESDR encontrou que um aumento da HbA1c na visita inicial está associada a um aumento do risco de desenvolver EMD. O risco relativo de desenvolver EMD é de 1.90, em doentes com valores de HbA1c entre 9.5 e 10.5%, e aumenta para 3.37, quando a HbA1c é superior a 12.1%, quando comparados com doentes com valores de HbA1c inferiores a 9.4% (Klein, Klein, *et al.* 1995). Moreira *et al.* também encontraram uma associação entre o aumento da HbA1c e o risco de EMD (Moreira *et al.* 2001).

A insulina, embora parte importante do controlo glicémico, pode aumentar o risco de desenvolvimento de RD e EMD (Poulaki *et al.* 2002; Zapata *et al.* 2010).

### **4.2.2. Hipertensão Arterial**

Muitos estudos têm implicado a hipertensão arterial com um aumento do risco de EMD (Klein *et al.* 2009; Ding & Wong 2012; Stratton *et al.* 2001). Ao aumentar a pressão de perfusão nos vasos da retina, a hipertensão arterial pode induzir disfunção adicional nos vasos da retina, já comprometidos pela diabetes, e induzir EMD e hemorragias intrarretinianas (Haefliger *et al.* 1994).

O WESDR encontrou uma associação entre a hipertensão diastólica e o aumento do risco de EMD (Klein *et al.* 1984c; Klein *et al.* 2009), confirmando observações de outros estudos epidemiológicos (Emanuele, Moritz, *et al.* 2009).

Saliente-se que o tratamento sistémico que se preconiza para o EMD inclui, para além do controlo metabólico, o ajuste da pressão arterial, ambos fundamentais (Kiire *et al.* 2013).

#### **4.2.3. Dislipidemia**

As medidas típicas dos lípidos sanguíneos incluem colesterol total, lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de alta densidade e os triglicerídeos.

Pensa-se que a hiperlipidemia causa disfunção endotelial através de respostas inflamatórias locais, tais como aumento dos níveis de citocinas e VEGF (Langeler *et al.* 1989), podendo comprometer a BHR e aumentar a permeabilidade.

O WESDR e o ETDRS mostraram uma associação entre a gravidade dos exsudatos duros na retina e o colesterol total e das lipoproteínas de baixa densidade (Chew *et al.* 1996; Klein *et al.* 2002). No DCCT, na diabetes tipo 1, o aumento dos lípidos séricos foi associado a um aumento do risco de EMCS e de exsudatos duros na retina (Miljanovic *et al.* 2004). Em doentes com diabetes tipo 2, sem lesões de RD ou com lesões de RDNP ligeira, mas sem EMD, um aumento do nível de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade foi recentemente associado a um aumento da espessura da retina macular central (Sasaki *et al.* 2014).

Alguns pequenos estudos mostraram o benefício das estatinas, agentes hipolipemiantes, na diminuição concomitante do EMD e exsudatos duros da retina (Gupta *et al.* 2004; Panagiotoglou *et al.* 2010).

#### **4.2.4. Nefropatia**

A nefropatia pode aumentar o EMD como resultado de uma diminuição da pressão osmótica plasmática. Alguns estudos têm mostrado que a microalbuminúria é um fator de risco independente para o EMD (Roy & Klein 2001; Klein, Klein, *et al.* 1995; Raman *et al.* 2010; Gilbert *et al.* 1998).

#### **4.2.5. Anemia**

A progressão da lesão vascular pela hipoxia associada à anemia poderá ser o mecanismo de ação. Um estudo prospectivo na Índia, em indivíduos com diabetes tipo 2 (N = 306), mostrou uma associação entre EMCS e anemia (Ajoy Mohan *et al.* 2011).

#### **4.2.6. Glitazonas**

As glitazonas diminuem a resistência à insulina na DM tipo 2, e assim diminuem a glicemia. Sabe-se que provocam retenção de fluidos sistêmicos e edema periférico (edema das extremidades inferiores) em cerca de 3 - 15% dos doentes (Ryan *et al.* 2006).

A associação entre as glitazonas e o EMD foi notada pela primeira vez em 2006 por Ryan *et al.* (Ryan *et al.* 2006). Mais recentemente, 2 grandes estudos confirmaram estes achados (Fong & Contreras 2009; Idris *et al.* 2012). Contudo, o estudo ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes) não encontrou associação entre a medicação com glitazonas e o EMD, depois de analisar a AV e as retinografias de cerca de 3500 doentes com diabetes tipo 2 (Ambrosius *et al.* 2010).

#### **4.2.7. Gravidez**

A gravidez parece aumentar o risco de desenvolvimento do EMD (DCCT 2000; Best & Chakravarthy 1997), num processo no qual as hormonas placentares podem estar implicadas (Sinclair *et al.* 1984).

### **4.3. Fatores Anatômicos e Estruturais**

Os mecanismos fisiopatológicos induzidos pela hiperglicemia na retina, com influência no desenvolvimento da RD, e das suas complicações, nomeadamente o EMD, foram discutidos na primeira parte desta tese. Faremos agora uma referência a algumas alterações anatómicas e estruturais da retina com papel importante no desenvolvimento e progressão do edema da retina.



### 4.3.1. Capilares Maculares

Os capilares da mácula estão distribuídos em 2 níveis na retina interna, com exceção da área adjacente à zona avascular da fóvea, em que existe apenas um nível, localizado na camada de células ganglionares. Fora da fóvea, os 2 níveis de capilares localizam-se, mais superficialmente, entre a camada de fibras nervosas e as células ganglionares, e, mais profundamente, na camada nuclear interna. A retina externa é avascular, e recebe oxigenação por difusão da coriocapilar.

Oitenta por cento dos MAs, e os de maiores dimensões, têm origem na camada nuclear interna (Moore *et al.* 1999) e fazem protusão em direção à camada plexiforme externa e nuclear externa (Byeon *et al.* 2012). Os MAs são particularmente frequentes no bordo de áreas da retina não perfundidas. A relação dos MAs com o EMD não é linear. A retina adjacente aos MAs não está necessariamente espessada e nem todos os MAs derramam contraste (Nishiwaki *et al.* 2002; Blair *et al.* 2008). Como previamente referido, com a oclusão capilar progressiva, os MAs podem encerrar, o que, inclusivamente, prognostica uma fase mais grave da doença retiniana (Cunha-Vaz 1992). Recentemente, Nunes *et al.* (Nunes *et al.* 2013) e Ribeiro *et al.* (Ribeiro *et al.* 2013) caracterizaram 3 fenótipos diferentes na RDNP ligeira, com base no *turnover* de MAs, isto é, a soma das taxas de formação e desaparecimento de MAs, e encontraram que o fenótipo que se caracteriza por elevado *turnover* de MAs, o fenótipo C, se associa a um maior risco de progressão para EMCS, confirmando as observações de estudos prévios (Nunes *et al.* 2009; Lobo *et al.* 2004). Blair *et al.* (Blair *et al.* 2008) não encontraram associação entre o número de MAs ou o derrame angiográfico associado e um aumento progressivo da espessura da retina. No entanto, sabe-se, desde há muito tempo, que a ablação de MAs com derrame angiográfico melhora comprovadamente o EMD (ETDRS 1985; Fong *et al.* 2007).

### 4.3.2. Área Macular Central

No EMD parece haver uma acumulação preferencial de fluido extracelular na área macular central, de que resulta aumento da espessura. A área central da retina está

predisposta para o desenvolvimento de edema devido à sua anatomia única. A avascularidade do centro da mácula é uma destas características. Noutras regiões da mácula, o fluido pode sair do espaço extracelular através do mecanismo de bomba do EPR, ou regressar ao espaço intravascular. No centro da mácula só existe o mecanismo do EPR. O aparecimento da estrela lipídica macular, frequente no EMD, é também um sinal da preferência do envolvimento do centro da mácula. A ação do EPR bombeia o fluido, mas as lipoproteínas, que precipitam maioritariamente na camada plexiforme externa (Murata *et al.* 1992), permanecem, visualizadas como exsudatos amarelos, e serão fagocitadas, lentamente, por macrófagos.

Outra característica é a presença de um número elevado de células, com uma atividade metabólica muito intensa. A retina central é constituída por 4 zonas concêntricas, que incluem a foveola no centro, rodeada pela fóvea, parafóvea e perifóvea. A foveola central (250 – 350  $\mu\text{m}$ ) contém a maior densidade de cones da retina e é responsável pela AV central, salientando a dependência da visão central da saúde da fóvea (Cunha-Vaz *et al.* 2014). A foveola é formada apenas por cones e células de Müller.

Por fim, a disposição das células na camada plexiforme externa, que se afastam lateralmente da fóvea, e a capacidade para poderem formar um potencial reservatório, que permite a acumulação de fluido extracelular, também são fatores relevantes (Scholl *et al.* 2010).

Em 15 - 30% dos casos de EMD surge um descolamento seroso da retina, normalmente subfoveal. Uma das hipóteses para o seu aparecimento é uma alteração da circulação coroideia subfoveal que surge em doentes com RD e, especialmente, com EMD (Nagaoka *et al.* 2004).

### **4.3.3. BHR**

Na retina existe a BHR, seletiva, formada por TJ entre as células endoteliais dos capilares da retina, a BHR interna, e entre as células do EPR, a BHR externa (Shakib &

Cunha-Vaz 1966). A BHR separa o sangue do tecido retiniano adjacente, controlando estreitamente a passagem de água e moléculas entre estes 2 “compartimentos”, e assim assegura a estabilidade dos neurónios e fotorreceptores, e as suas funções fisiológicas.

As fases iniciais da RD são caracterizadas por uma alteração da BHR interna, que vai levar à formação do edema (Cunha-Vaz *et al.* 2011; Cunha-Vaz *et al.* 1975). A diabetes induz a redistribuição da ocludina, componente estrutural das TJ, na superfície celular (Barber *et al.* 2000) e altera as proteínas que as constituem (Bucolo *et al.* 2009; Klaassen *et al.* 2009; Leal *et al.* 2007), num processo no qual o VEGF e a ativação da PKC têm sido implicados (Murakami, Frey, *et al.* 2012), levando à rutura da BHR, o mais importante mecanismo para o desenvolvimento do edema da mácula (Gardner *et al.* 2002).

A rutura da BHR permite um aumento do fluxo de água e proteínas plasmáticas através da parede vascular para o espaço extracelular, e a consequente retenção de proteínas no tecido retiniano induz adicional movimento, e retenção, de água por osmose, contribuindo para a formação, manutenção e aumento do edema macular.

#### **4.3.4. Retina Neurosensorial**

A disfunção das células de Müller e a disfunção dos astrócitos, cuja produção da proteína ácida fibrilar glial está alterada na diabetes, também têm sido implicados na rutura da BHR (Gardner *et al.* 2002).

A porção sináptica da camada plexiforme externa e toda a camada plexiforme interna compreendem as 2 barreiras com maior resistência à difusão intersticial de fluido da retina interna para fora através da coroideia (Antcliff *et al.* 2001; Antcliff & Marshall 1999). Nestas camadas, a densidade dos complexos juncionais entre as células e a tortuosidade dos processos celulares combinam-se para impedir fortemente o fluxo extracelular de água e solutos (Antcliff *et al.* 2001). A membrana limitante externa restringe os movimentos de grandes moléculas, embora, menos

seletiva que a BHR, possa ser atravessada pela albumina (Scholl *et al.* 2010). O grau de movimento de albumina através da retina é significativo e influencia o desenvolvimento de edema; grandes moléculas não podem difundir através da retina, e permanecem parcialmente bloqueadas a nível da membrana limitante externa durante algum tempo (Scholl *et al.* 2010). Ao serem retidas as proteínas, a água é também retida, osmoticamente. A membrana limitante interna provavelmente não tem influência significativa no movimento da água e solutos (Scholl *et al.* 2010).

#### **4.3.5. Vítreo**

A diabetes altera a estrutura do vítreo, o que pode aumentar a tração tangencial sobre a mácula e assim induzir ou exacerbar o EMD (Sebag & Balazs 1984; Ikeda *et al.* 1999b; Ikeda *et al.* 1999a). Hikichi *et al.* observaram, em 82 indivíduos com diabetes tipo 2, uma maior percentagem de EMD nos que não tinham descolamento posterior do vítreo, e que, durante o período de seguimento, o descolamento do vítreo poderia promover a resolução espontânea do edema (Hikichi *et al.* 1997). Estas observações estão de acordo com o facto de que a separação espontânea do vítreo ou o descolamento cirúrgico do vítreo podem levar a melhoria do edema da retina (Bandello *et al.* 2003; Haller *et al.* 2010; J I Patel *et al.* 2006).

#### **4.3.6. EPR**

O papel do EPR, e da BHR externa, tem sido negligenciado no desenvolvimento do EMD, embora a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , um mecanismo ativo, seja importante para eliminar o fluido do espaço extracelular e subretiniano através da coroideia (Quintyn & Brasseur 2004). Efetivamente, lesões no EPR foram observadas pouco tempo depois de indução de diabetes em animais (Tso *et al.* 1980), postulando-se que uma pequena percentagem de casos de EMD se poderá dever ao aumento da permeabilidade do EPR, que permite a passagem de fluido da coriocapilar para a retina sensorial (Weinberger *et al.* 1995; Ferris & Patz 1984). Por outro lado, é importante notar que, em doentes com EMD/EMCS, foi observado que a permeabilidade dos capilares da retina aumenta cerca de 12 vezes, enquanto a atividade de bomba do EPR aumenta,

apenas, 2 vezes, pelo que o balanço final favorece a acumulação extracelular de fluido (Sander *et al.* 2001).

**Em resumo:** no EMD existe aumento da espessura da retina macular central, que pode ser medida objetivamente com o OCT, maioritariamente por acumulação de fluido no espaço extracelular da retina. O fluido deriva, primariamente, da disfunção da célula endotelial e perda de pericitos; rutura da BHR interna, mas também externa; e aumento da permeabilidade dos capilares retinianos, processos que ocorrem precocemente na retina diabética.

#### **4.4. Fisiopatologia do Edema Macular**

Em condições fisiológicas, vários fatores interagem para prevenir a acumulação proteica e de fluido intrarretiniano extracelular, e manter a retina “seca”: forças osmóticas, forças hidrostáticas, permeabilidade capilar e a “compliance” do tecido retiniano. Do balanço entre estes fatores, ou seja, taxa de filtração e de remoção do fluido extracelular equilibradas, resulta a homeostasia da retina. Compete à BHR manter este estado fisiológico.

Quando ocorre aumento do conteúdo em água do tecido retiniano, este pode ser inicialmente intra ou extracelular. Nas fases iniciais da RD podem, então, ocorrer e coexistir 2 situações: BHR interna “intacta”, ou rutura da BHR interna, correspondendo a uma BHR “aberta” (Cunha-Vaz & Travassos 1984; C. Lobo *et al.* 1999).

##### **4.4.1. Edema Intracelular**

Em condições fisiológicas, todas as células têm sistemas de transporte membranar que mantêm um balanço constante entre o movimento de iões e água para dentro e para fora da célula. Uma alteração metabólica, por exemplo a isquemia, pode lesar os canais iónicos e levar a edema da célula, ou intracelular.

Similarmente na diabetes, quando a BHR (ainda) está intacta pode ocorrer um edema intracelular das células de Müller da retina (Wurm *et al.* 2011). Trata-se de uma

situação de edema citotóxico, que pode resultar de isquemia, trauma ou lesão celular tóxica (Otani *et al.* 1999; Cunha-Vaz 2001; Yanoff *et al.* 1984). O edema citotóxico pode levar à lesão celular e posterior libertação de substâncias vasoativas, como os radicais livres ou o óxido nítrico, e progredir para o edema vasogénico, ao induzir rutura da BHR (C. Lobo *et al.* 1999; Ferris & Patz 1984; Cunha-Vaz *et al.* 2011; Martidis *et al.* 2002).

#### **4.4.2. Edema Extracelular**

O EMD é preponderantemente extracelular, e está diretamente associado a uma BHR interna “aberta” ou rutura da BHR interna, uma das primeiras alterações que ocorre na retina diabética (Cunha-Vaz *et al.* 1975; Cunha-Vaz *et al.* 2014). Este edema também é denominado de edema vasogénico. A rutura da BHR permite a deposição extracelular de proteínas, o que aumenta a pressão osmótica e induz o movimento de água para este espaço (C. Lobo *et al.* 1999).

A permeabilidade da BHR aumentada pode ser avaliada, qualitativamente, pela AF, através do derrame de produto de contraste, e quantitativamente, pela fluorofotometria do vítreo (Cunha-Vaz *et al.* 1975). Nas fases iniciais, este tipo de edema é caracterizado pela sua reversibilidade. A expansão do espaço extracelular traduz-se em aumento da espessura e volume da retina, que pode ser medida por métodos objetivos, como o retinal thickness analyzer (RTA) e o OCT.

A lei de Starling é o princípio geral que descreve o movimento de fluidos para dentro e para fora dos capilares do organismo, dependendo do balanço entre as pressões hidrostática e oncótica. Na retina, a lei de Starling aplica-se ao edema vasogénico, quando a BHR interna está “aberta” (Cunha-Vaz & Travassos 1984). Assim, a perda de equilíbrio no gradiente das pressões hidrostática, oncótica e osmótica, através dos vasos da retina, contribui para o movimento de fluidos e resulta em aumento do edema.

A força que movimenta o fluido através da parede capilar é resultante da permeabilidade da BHR, e da diferença entre a pressão hidrostática ( $\Delta P$ ) e a pressão osmótica efetiva ( $\Delta \sigma \pi$ ), entre o lúmen capilar e o interstício da retina, de acordo com a seguinte equação:

(Força)

$$= L_p [(P_{\text{plasma}} - P_{\text{tecido}}) - \Delta \sigma (\pi_{\text{plasma}} - \pi_{\text{tecido}})];$$

Sendo:  $L_p$  – condutividade hidráulica ou permeabilidade da BHR;  $P_{\text{plasma}}$ , a pressão hidrostática no lúmen capilar ou pressão arterial;  $P_{\text{tecido}}$ , a pressão hidrostática no tecido da retina;  $\sigma$ , um coeficiente de reflexão osmótica;  $\pi_{\text{plasma}}$ , a pressão osmótica do plasma;  $\pi_{\text{tecido}}$ , a pressão osmótica do tecido da retina.

A pressão hidrostática capilar é determinada pela pressão arterial, enquanto a pressão hidrostática intersticial é aproximadamente a mesma que a pressão intraocular. A pressão oncótica capilar é criada, maioritariamente, pela albumina, enquanto a pressão oncótica intersticial, se existir um endotélio vascular saudável, é determinada pelas proteínas intersticiais.

Um aumento da  $P_{\text{plasma}}$ , por exemplo por aumento da pressão arterial, ou uma diminuição da  $P_{\text{tecido}}$ , por perda celular, formação de quistos intrarretinianos ou tração do vítreo (Lewis *et al.* 1992), ou ambas, contribui para o movimento de fluidos para o tecido retiniano e aumento do edema extracelular da retina. Efetivamente, na diabetes tipo 2, a redução da pressão arterial sistémica tem sido associada a uma melhoria do EMD (Matthews *et al.* 2004; Stratton *et al.* 2001). Saliente-se, no entanto, que o aumento da  $P_{\text{plasma}}$ , por aumento da pressão arterial, contribui para a formação do edema apenas após ocorrer perda do mecanismo de autorregulação do fluxo sanguíneo da retina e rutura da BHR interna. A hipertensão arterial sistémica, *per si*, normalmente não causa edema da retina, devido ao mecanismo de autorregulação dos vasos da retina e às características estruturais da BHR.

A diminuição da pressão intersticial, por perda de coesão do tecido retiniano, por exemplo por tração vítrea, aumenta a *compliance* da retina, permitindo uma rápida acumulação de fluido e facilitando o aumento da espessura da retina. A tração vítrea parece desempenhar um papel importante ao impedir a reabsorção do edema e a recuperação (Ghazi *et al.* 2007).

Quando há uma alteração da BHR interna, a retenção e acumulação de proteínas e lipoproteínas na retina aumenta a pressão osmótica no tecido retiniano e “arrasta” mais fluido para o espaço extracelular, contribuindo para manter e aumentar o edema. A diminuição da pressão oncótica capilar, por síndrome nefrótico ou doença hepática grave, para um nível que contribua para a formação de edema, é uma situação extremamente rara.

Existe também a “teoria do oxigênio” para explicar a fisiopatologia do EMD (Stefánsson 2006). De acordo com esta teoria, a hiperglicemia prolongada leva a diminuição da perfusão da retina interna e diminuição da tensão de oxigênio. As arteríolas da retina dilatam, pela resposta autorregulatória, o que leva a aumento da pressão hidrostática nos capilares, que os lesa (Stefánsson 2006). A diminuição da tensão de oxigênio na retina promove, também, a libertação de VEGF e outros fatores da permeabilidade, aumentando a permeabilidade microvascular.

Em resumo:

Na RD a lesão da célula endotelial compromete as TJ intercelulares, e a integridade da BHR. O aumento da permeabilidade vascular permite a acumulação proteica na retina, o que aumenta a pressão osmótica do tecido. Ou seja, a alteração inicial da BHR permite que as diferenças entre as pressões hidrostáticas e osmóticas passem a desempenhar um papel importante. A progressão do edema, desde uma forma subclínica até ao EMCS, vai depender diretamente não só do gradiente oncótico, mas também, do gradiente da pressão hidrostática, entre o lúmen capilar e o interstício da retina.



#### 4.5. Classificação Clínica da RD e do EMD

As classificações são uma forma de categorizar as alterações do fundo do olho observadas na RD, facilitar a comunicação e, como objetivo final, melhorar a assistência aos doentes.

Da necessidade de criar um sistema de classificação clínica consensual e internacionalmente aceite para a RD e o EMD surgiu, em 1968, a classificação de Arlie House, desenvolvida por um painel de 12 membros durante um simpósio que decorreu em Arlie House, nos EUA. Este sistema usava 5 campos fotográficos e as lesões na retina eram classificadas nas fotografias do fundo ocular em uma de três categorias, em “ausente”, “ligeiro a moderado” ou “grave”. Os investigadores sentiram dificuldade em distinguir “ligeiro a moderado” de “grave”, e as lesões eram frequentemente aglomeradas na categoria “ligeiro a moderado”. Subsequentemente, o estudo DRS criou uma modificação desta classificação, acrescentando mais campos fotográficos e mais graus de gravidade (DRS 1981a). Posteriormente, na década de 80, o estudo ETDRS, que incluiu 3711 doentes diabéticos, foi desenhado para avaliar o efeito do laser na RDNP, moderada a grave, RDP inicial e no EMD. O grupo de estudo do ETDRS introduziu alterações adicionais no sistema de classificação, nomeadamente para a distinção entre as formas “moderada” e “grave”, que incluíram a classificação de exsudatos duros, manchas algodinosas, alterações arteriovenosas, elevação da retina e hemorragia do vítreo, e criou uma escala ETDRS interina e, por fim, final (ETDRS 1991e; ETDRS 1991d). Embora seja um esquema particularmente complicado, difícil de implementar na prática clínica (Lawrence 2004), com mais níveis do que seria necessário no quotidiano, e que requerem comparação com fotografias *standard*, tornou-se no esquema padrão para a classificação da gravidade da RD em ensaios clínicos, amplamente usada em investigação, publicações e reuniões científicas (Singer *et al.* 1992; DCCT 1995a). Esta escala tem valor prognóstico, ou seja, com base no nível de gravidade das lesões de retinopatia na escala ETDRS, é possível antever o risco de progressão para RDP de alto risco, após 1, 3 e 5 anos (ETDRS 1991b).

No entanto, esta classificação apresenta limitações. É avaliada, apenas, a gravidade e/ou extensão das alterações características da RD, não fornece dados de gravidade globais e avalia somente a progressão para RDP. A escala ETDRS é inteiramente baseada no pressuposto que a retinopatia é homogénea em todos os doentes diabéticos e progredirá, inexoravelmente, para a forma proliferativa. Por outro lado, não dá informação sobre a forma “ligeira” da RD, provavelmente a mais interessante pela sua reversibilidade, e que poderá responder à intensificação do tratamento médico ou a novas formas de tratamento. Por exemplo, os MAs, uma alteração frequente e importante na diabetes, não são contabilizados; a oclusão capilar, que não é passível de ser identificada nas fotografias a cores do fundo ocular, também não está incluída nesta classificação. Por fim, como se viu, a alteração da BHR e o edema da mácula também não “encaixam” nesta classificação, e como tal, o edema macular foi separadamente definido e classificado.

O ETDRS definiu o edema macular como o espessamento da retina numa área localizada a 1 disco de diâmetro do centro da mácula, ou pela presença de exsudatos duros nesta região. Adicionalmente, o edema macular foi mais estritamente definido como EMCS, envolvendo a fóvea, quando pelo menos uma das 3 características seguintes está presente, na avaliação clínica ou nas fotografias a cores do fundo ocular:

- Espessamento da retina nos 500 µm centrais da mácula;
- Exsudatos duros nos 500 µm centrais da mácula, quando associados a espessamento da retina adjacente (e não exsudatos duros “residuais”, que permanecem após o desaparecimento do aumento da espessura);
- Uma área ou áreas de espessamento da retina com pelo menos 1 disco de área, em que qualquer parte está localizada a pelo menos 1 disco de diâmetro do centro da mácula (ETDRS 1985).

Ficou demonstrado que o tratamento do edema macular com laser focal, quando atingido o limiar de EMCS, é benéfico, reduzindo em cerca de 50% o risco de perda moderada de AV (24% para olhos não tratados *versus* 12% nos olhos tratados, aos 3 anos), e aumentando a possibilidade de melhoria da AV, com perdas mínimas no campo visual (ETDRS 1985). O protocolo de tratamento laser não mostrou redução do risco de perda moderada de AV quando aplicado antes do aparecimento de EMCS, pelo que o ETDRS recomendou o tratamento imediato com laser apenas quando atingido o patamar de EMCS.

O estudo ETDRS decorreu antes da “era” do OCT, pelo que o nível de gravidade da RD e a presença e extensão do EMD foram classificados, na visita inicial, pela análise das fotografias estéreo do fundo ocular e, nas visitas de seguimento, as decisões de re-tratamento basearam-se nos achados da biomicroscopia com lâmpada de fenda. O diagnóstico de EMCS, crítico para determinar a necessidade de tratamento e re-tratamento com laser, baseia-se, pois, na perceção individual de aumento da espessura da retina central (na fóvea), difícil e subjetiva (Emanuele, Klein, *et al.* 2009). A dificuldade abrange, não só a apreciação de aumento da espessura da retina, mas também, a distinção de exsudatos duros, não residuais, bem como, o envolvimento relativo dos 500 µm na área macular central. A avaliação clínica parece ser também relativamente insensível a pequenas alterações da espessura da retina, identificadas por métodos objetivos de medição da espessura da retina, como o OCT e o RTA (Brown *et al.* 2004; Shahidi *et al.* 1991; Yasukawa *et al.* 1998; Yang *et al.* 2003); não reflete a gravidade e extensão do edema, a origem do fluido, ou qual a camada da retina envolvida (Kang *et al.* 2004), e não permite quantificar. A definição de EMCS tem sido considerada complexa e difícil de aplicar na prática clínica, até pelos seus mentores (Emanuele, Klein, *et al.* 2009).

Por outro lado, estudos que analisaram e compararam o diagnóstico de EMCS pelos métodos clínico *versus* fotográfico observaram divergências na classificação de alguns doentes, tendo sido reportados coeficientes de concordância que variam entre 0,31 e 0,55 (Emanuele, Klein, *et al.* 2009; Kiri *et al.* 1996). No ETDRS foi encontrada

uma concordância de 0,61 (81%) (Kinyoun *et al.* 1989); noutros estudos, Gonzalez *et al.* e Rudnisky *et al.* encontraram uma concordância de 0,68 e de 0,8, respetivamente (Gonzalez *et al.* 1995; Rudnisky *et al.* 2002). Em geral, a deteção clínica é menos sensível que a análise das fotografias do fundo ocular (Emanuele, Klein, *et al.* 2009; Rudnisky *et al.* 2002).

Mais recentemente, em 2003, um grupo internacional de especialistas propôs escalas (mais) simplificadas para classificação da gravidade da RD e do EMD, independentes, baseadas nos resultados do ETDRS e WESDR, com o objetivo de melhorar o rastreio de doentes com RD e facilitar a comunicação e a transferência de informação entre médicos (Wilkinson *et al.* 2003). A escala de gravidade da RD considera 5 níveis. O primeiro nível consiste na “ausência de RD” e o segundo nível em “RD ligeira”, que inclui o nível 20 da classificação ETDRS (apenas MAs). Ambos os grupos apresentam baixo risco de progressão da doença ao longo do tempo. O terceiro nível consiste em “RDNP moderada”, inclui os níveis ETDRS 35 a 47. O quarto nível consiste em “RDNP grave”, níveis ETDRS > 53, com alto risco de progressão para RDP. O limiar para a classificação no nível 4 é a identificação da presença e gravidade de 3 tipos de lesões retinianas, consistentes com a regra 4:2:1, para simplificar a deteção deste nível. Consiste na observação de hemorragias intrarretinianas extensas ( $\geq 20$ ), nos 4 quadrantes; anomalias venosas, em  $\geq 2$  quadrantes; ou anomalias microvasculares intrarretinianas proeminentes, em  $\geq 1$  quadrante. O quinto nível, “RDP” inclui olhos com neovascularização definitiva, hemorragia pré-retiniana ou do vítreo. Foi proposta uma escala de gravidade do EMD, independente. Esta escala separa, inicialmente, olhos com EMD aparente daqueles que não apresentam aumento da espessura da retina ou exsudatos lipídicos na mácula (“EMD aparentemente ausente”). Se a retina for examinada com estereopsia, 3 níveis de gravidade do EMD são diferenciados, com base na distância ao centro da mácula do espessamento da retina e/ou dos exsudatos lipídicos. Olhos com EMD “ligeiro” apresentam lípidos e/ou edema distantes do centro; “moderado” se as lesões ameaçam a fóvea e “grave” quando se observa franco envolvimento da fóvea pelo edema e/ou lípidos. No entanto, este esquema não melhora a caracterização das fases mais iniciais, e não

parece acrescentar dados que melhorem a compreensão ou a conduta da doença retiniana.

Em conclusão, a classificação clínica do EMD, pela avaliação na lâmpada de fenda e/ou classificação das fotografias a cores do fundo ocular, com base nos critérios de EMCS propostos pelo estudo ETDRS, é difícil de implementar, dependente do observador, e por isso variável e subjetiva. Inclusivamente, têm sido observadas disparidades entre os métodos de avaliação por biomicroscopia na lâmpada de fenda e a classificação fotográfica.

Esta classificação não dá informação sobre as formas mais iniciais do envolvimento da retina na diabetes, potencialmente reversíveis, e não quantifica o espessamento da retina.

Estes achados indicam a necessidade de usar métodos objetivos e quantitativos, na prática clínica e em investigação, para detetar e monitorizar o edema na área macular, para complementar a informação clínica.

Com o aparecimento de novas metodologias, particularmente o OCT, a avaliação mais objetiva do EMD passou a ser possível. O OCT tem mudado de forma substancial a nossa compreensão da incidência, evolução e progressão do EMD. Este método não invasivo permite identificar o EMD, desde as fases mais iniciais, e caracterizá-lo quanto ao tipo e distribuição, evolução, fisiopatologia e grau de envolvimento da área macular central.

#### **4.6. Diagnóstico do EMD – Contributo pessoal**

O edema macular pode complicar e ser aparente em qualquer fase da RD, desde as mais iniciais, embora a prevalência aumente com o aumento da gravidade da RD adjacente (Emanuele, Moritz, *et al.* 2009; Browning, Fraser & Clark 2008). Surge como consequência do extravasamento de água e macromoléculas, que ocorre através de

uma BHR interna disfuncional, uma das alterações mais precoces na doença retiniana associada à diabetes (Cunha-Vaz *et al.* 1975; Cunha-Vaz *et al.* 2011).

O edema macular permanece como a principal causa de perda de AV na DM (Antonetti *et al.* 2012; Cunha-Vaz *et al.* 2014; Kiire *et al.* 2013). O diagnóstico precoce do EMD é particularmente relevante, dada a sua elevada frequência, em especial na diabetes tipo 2, e a associação com futura perda e incapacidade visual. A intervenção precoce, tendo como alvo alterações iniciais reversíveis, que poderão responder à intensificação do controlo metabólico e das patologias sistémicas associadas, modificação do estilo de vida, intervenção de outras especialidades e, em particular, a novas modalidades terapêuticas, é uma prioridade para preservar a visão.

No entanto, a alteração visual é relativamente tardia na progressão do EMD. A AV permanece normal até cerca de 55% dos canais neuroretinianos estarem afetados (Frisén & Frisén 1976), e a zona avascular da fóvea pode estar aumentada em indivíduos diabéticos sem sinais de alteração da AV (Arden *et al.* 1986). Por outro lado, a avaliação clínica e fotográfica do EMD/EMCS têm limitações na deteção precoce do edema macular, não sendo, por isso, métodos adequados para investigar e seguir estas fases da doença. Portanto, a identificação e caracterização das fases precoces da doença retiniana na diabetes envolve o uso de metodologia quantitativa e sensível.

O OCT é um método que permite a quantificação objetiva da espessura da retina na área macular (Puliafito *et al.* 1995), de forma reprodutível e não invasiva. Em doentes com RD/EMD tem permitido quantificar alterações da espessura da retina, e caracterizar o EMD quanto ao tipo e distribuição, evolução temporal, fisiopatologia e grau de envolvimento da área macular central.

Desde a sua introdução, o OCT modificou profundamente a nossa compreensão do EMD, ao permitir detetar alterações da espessura ou da morfologia da retina, não aparentes clinicamente, com repercussão no diagnóstico do EMD, cada vez mais precoce, e implicação na conduta terapêutica.

É atualmente um método imagiológico de escolha diária na prática clínica e incluído em todos os projetos de investigação em doentes diabéticos; complementa os achados da avaliação clínica e fotográfica do fundo ocular, e está na base das decisões de diagnóstico do EMD, escolha do método de tratamento mais adequado e indicação para novo tratamento. Deve ser salientado que esta atual “dependência” do OCT exige estabelecer novas definições, nomeadamente parâmetros de espessura, valores de “corte”, amplamente aceites, que permitam presumir com alguma certeza a presença da doença e da sua atividade, em particular nas fases iniciais, frequentemente assintomáticas.

Os biomarcadores tornaram-se a base da medicina preventiva, a medicina que reconhece a doença ou o risco de doença precocemente, e previne o seu desenvolvimento. Permitem identificar indivíduos de alto risco, para que possam ser tratados antes do início da doença ou o mais precocemente possível. Desta forma, os biomarcadores poderão permitir a implementação de uma medicina personalizada. Na diabetes existe, pois, uma clara necessidade de identificar biomarcadores de risco e prognósticos da progressão da doença retiniana. O edema macular subclínico, identificado com o OCT em indivíduos diabéticos, nas fases iniciais da doença retiniana, parece ser um bom candidato a biomarcador de progressão das lesões de RD para EMCS.

O contributo que se pretende dar com esta tese baseia-se nos resultados de vários estudos que temos realizado nas fases iniciais da RD, em indivíduos com DM tipo 2.

Nas fases iniciais da doença retiniana diabética observámos, usando o RTA e o OCT, alterações, locais ou globais, dos valores da espessura da retina, diretamente associados aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão das lesões de RD (rutura da BHR, neurodegeneração).

Nas fases iniciais da RD detetámos, também, a presença de edema macular subclínico e avaliámos a sua progressão. A presença de edema macular subclínico

parece ter valor preditivo na progressão das lesões de RD para EMCS e, portanto, ser um bom candidato a biomarcador de progressão da RD.

O uso do OCT como um dos métodos de eleição para a decisão de diagnóstico e tratamento do EMD, em adição à avaliação clínica e fotográfica do fundo ocular, implica estabelecer novas definições e critérios da presença de doença. A prática clínica e o desenho de protocolos de ensaios clínicos assim o exigem. Pretendemos assim clarificar e estabelecer, através da literatura disponível e de dados obtidos em estudos clínicos no nosso centro em grupos de indivíduos normais, valores de “corte” que permitam presumir, com alguma certeza, a presença da doença e da sua atividade.

#### **4.6.1. Avaliação Clínica do EMD**

O edema macular é normalmente avaliado pela observação na lâmpada de fenda com estereopsia e com lente de contacto, através da pupila dilatada (McDonald *et al.* 2007; Chew *et al.* 2003). Esta avaliação clínica é difícil, requerendo uma experiência considerável do examinador e cooperação do doente, pelo que tem sido caracterizada pela variabilidade entre clínicos (Emanuele, Klein, *et al.* 2009; Kinyoun *et al.* 1989; McDonald *et al.* 2007).

Por definição, o diagnóstico de EMCS é clínico, baseado na avaliação estereoscópica com lâmpada de fenda ou nas fotografias a cores do fundo ocular, que permitem a sua documentação (Kiri *et al.* 1996; ETDRS 1985; Virgili *et al.* 2007). O diagnóstico não se baseia na AF, embora esta possa ser útil para identificar locais de derrame de contraste, que orientam o tratamento laser, e áreas de não perfusão capilar, com implicação prognóstica.

A biomicroscopia com lâmpada de fenda pode revelar, apenas, uma alteração do reflexo da fóvea. Embora conveniente e prontamente disponível, esta técnica é subjetiva e insensível a pequenas alterações da espessura da retina, tornando a deteção precoce e o seguimento de pequenas alterações após tratamento difíceis (Brown *et al.* 2004; Ozdek *et al.* 2005; Hee, Puliafito, *et al.* 1995; Shahidi *et al.* 1991).



Adicionalmente, a avaliação biomicroscópica na lâmpada de fenda não quantifica a gravidade ou extensão do espessamento na fóvea, quais as camadas da retina envolvidas, e não permite avaliar a presença de oclusão capilar (isquemia).

A classificação do EMD em focal ou difuso (Bandello *et al.* 2003), com origem, respetivamente, em MAs ou capilares maculares dilatados hiperpermeáveis (Bresnick 1983), tem sido usada por alguns autores, embora de forma inconsistente, sem uma clara distinção (Browning, Altaweel, *et al.* 2008). Face à ambiguidade da definição destes termos na literatura, Browning *et al.* sugeriram que fossem empregues com precaução (Browning, Altaweel, *et al.* 2008). Esta classificação tem sido usada, e parece fazer mais sentido, para descrever padrões angiográficos no EMD (Ozdek *et al.* 2005; Kang *et al.* 2004; Byeon *et al.* 2012)

Refira-se, ainda, que atualmente a observação do fundo ocular é preferentemente realizada com lentes de não contacto, sofisticadas, e que permitem a observação do fundo ocular com binocularidade (Virgili *et al.* 2007). No entanto, o uso destas lentes, em relação ao uso de lentes de contacto para observação do fundo ocular, parece ser menos sensível na deteção do EMCS em aproximadamente 10% dos casos (Brown *et al.* 2004). Por outro lado, o uso de uma lente de contacto evita o pestanejo do doente e os movimentos oculares, que interferem com a qualidade da avaliação clínica, e pela magnificação axial, poderão permitir a deteção de áreas subtis de edema (Brown *et al.* 2004).

A fotografia a cores do fundo ocular é limitada pela quantidade de estereopsia e limiar de espessamento individual de cada *grader* (Kinyoun *et al.* 1989; Yang *et al.* 2003), e não permite avaliar a oclusão capilar ou a alteração da BHR que precede o desenvolvimento de edema. Embora a fotografia a cores do fundo ocular tenha sido usada para seguir alterações pós tratamento, atualmente o seu uso em ensaios clínicos diminuiu significativamente, face ao uso crescente, cada vez mais disponível, do OCT.

As fotografias e as imagens digitais do fundo ocular devem ser obtidas de acordo com protocolos, para permitir a comparação posterior. Podem ser captadas de forma

estereoscópica ou não; usando o campo de 30º (ou 35º), 45º - 50º ou 60º, de acordo com a magnificação pretendida (quanto maior o campo, menor o detalhe). Os “7 campos *standard*” foram descritos na classificação de Arlie House e usados no estudo DRS. Posteriormente, o ETDRS alterou este protocolo, criando “7 campos *standard* modificado” (ETDRS 1991e), que se tornou no protocolo mais usado até à data. Deve ser contudo salientado que este é um método não-invasivo, tecnicamente fácil e bem aceite pelos doentes, com utilidade demonstrada em estudos multicêntricos (DRS, ETDRS, DCCT, UKPDS).

A comparação entre os métodos clínico e fotográfico na avaliação do EMCS tem mostrado discordâncias (Kinyoun *et al.* 1989; Rudnisky *et al.* 2002; Gonzalez *et al.* 1995). Aparentemente, o diagnóstico clínico subestima a presença de EMCS (Emanuele, Klein, *et al.* 2009). A importância da falta de precisão na deteção e classificação da doença foi realçada, por exemplo, como o fator que explica as discrepâncias nos resultados aferidos em ensaios clínicos *versus* estudos comunitários (Lee & Blumberg 2008). Aparentemente, o OCT tornou possível uma maior uniformidade na intervenção e na avaliação de resultados pós tratamento (Browning *et al.* 2004; Brown *et al.* 2004).

### **Em conclusão**

Os métodos tradicionais para a avaliação clínica do EMD/EMCS, a observação fundoscópica na lâmpada de fenda e as fotografias a cores do fundo ocular, são subjetivos e dependentes da experiência do observador, o que os torna muito variáveis, para além de que não permitem quantificar. Sozinhos não parecem ser uma metodologia adequada para uma correta conduta da diabetes e das suas manifestações oftalmológicas, desde as fases mais iniciais.

Para detetar e monitorizar o edema na área macular, e identificar precocemente a sua presença, e para maior harmonização dos critérios usados para classificação da presença e gravidade da doença retiniana, na prática clínica e investigação, em centros diferentes, tornou-se pois necessário, e atualmente indispensável, o uso de métodos

objetivos e quantitativos, reprodutíveis, não dependentes ou variáveis com o observador.

Efetivamente, nos últimos anos, duas tecnologias que permitem medir objetivamente e de forma não invasiva a espessura da retina na área macular, evidenciaram-se e tornaram-se disponíveis, o RTA e o OCT. Com o tempo, o RTA deixou, contudo, de ser usado na prática clínica, suplantado pelo OCT, que proporciona mais informação sobre as alterações estruturais da retina e é superior nas formas mais avançadas do edema macular.

O OCT tem permitido avaliar a espessura da retina, e alterações desta, na área macular em múltiplas patologias da retina, de forma não-invasiva e reprodutível.

A avaliação objetiva do EMD realizada com o OCT tem mudado de forma substancial a nossa compreensão da incidência, evolução e progressão, bem como, dos mecanismos fisiopatológicos do EMD.

Em indivíduos diabéticos, para preservar a visão, a conduta que se preconiza é, em primeiro lugar, prevenir a RD, e depois, face ao desenvolvimento inevitável de lesões na retina, detetar e tratar precocemente as formas complicadas da doença. Estas são as prioridades que têm sido claramente definidas e defendidas. Nesta matéria o OCT tem dado importantes contributos.

Nos diabéticos com lesões iniciais de RD, o OCT tem permitido identificar o edema macular subclínico, não perceptível na avaliação clínica ou fotográfica do fundo ocular, mas com aparente valor preditivo de progressão das lesões de RD para EMCS, a complicação da RD que mais frequentemente se associa nos diabéticos à incapacidade visual permanente.

## 4.6.2. RTA

### 4.6.2.1. Introdução

O RTA é um método ótico que permite medir a espessura da retina, utilizando o princípio da biomicroscopia com lâmpada de fenda. Realiza de forma rápida e sequencial *scans* em fendas verticais através da retina para gerar mapas topográficos de espessura da retina.

O RTA foi desenvolvido pelo grupo do Professor Ran Zeimer (Ophthalmic Physics Laboratory of the Wilmer Eye Institute, Johns Hopkins University, Baltimore, USA) em colaboração com a Talia Technology LTD. (Mevaseret Zion, Israel), com o intuito de criar um método objetivo e quantitativo para mapear a espessura da retina na mácula (Zeimer, Shahidi, *et al.* 1989; Zeimer, Mori, *et al.* 1989; Shahidi *et al.* 1991).

O princípio deste sistema baseia-se na projeção oblíqua de uma pequena fenda de luz laser na retina e na sua visualização segundo um determinado ângulo, de um modo semelhante a uma lâmpada de fenda. A separação entre as reflexões da interface vitreoretiniana e da interface coriorretiniana dá uma medida da espessura da retina.

### 4.6.2.2. Instrumentação

O sistema ótico deste aparelho consiste na projeção de uma fenda estreita de laser verde Helium-Neon (540 nm) através de um espelho de varrimento e da combinação de 2 lentes, uma esférica de 100-mm e uma cilíndrica de 300-mm para a focagem no fundo ocular. A nível do fundo, a fenda tem 2 mm de altura e teoricamente 10 µm de largura. Existe uma lente pré corneana de 60 dioptrias que permite criar uma imagem da retina, eliminando a necessidade de uso de lente de contacto durante a visualização e aquisição das imagens. O espelho de varrimento está colocado no plano conjugado da pupila e o movimento de rotação provoca o varrimento do feixe na área macular. O feixe é deslocado para a nova posição durante o intervalo entre as aquisições das imagens vídeo. Durante o alinhamento é colocado eletronicamente um filtro que reduz a potência do laser e que é removido durante a

aquisição das imagens. Cada imagem obtida da interseção da fenda de laser com a retina, designada como corte ótico da retina, é gravada por uma câmara de vídeo e digitalizada.

A “stereobase”, a distância no plano pupilar entre o feixe de entrada e saída, é determinada por orifícios no sistema ótico. Com distâncias de 2 a 4 mm entre estes orifícios é necessário obter uma dilatação da pupila de 4 a 6 mm. Geralmente é utilizado uma separação de 3 mm, correspondendo a uma dilatação da pupila de 5 mm.

São adquiridas 50 imagens por segundo, o que permite que os 10 cortes, separados 200 µm uns dos outros, numa zona de 2X2 mm, sejam adquiridos em 200 ms. A rapidez da aquisição torna possível que as imagens obtidas não sejam influenciadas pelos movimentos sacádicos do olho. Além disso, as aquisições do RTA não dependem de pequenos movimentos axiais, atendendo a que estes não afetam a focagem das imagens nem a “stereobase”.

Para obter uma imagem adequada para análise, a potência máxima na retina, da fenda de 2 mm, é de 180 microwatts (540 nm) e é projetada em cada local durante apenas 20 ms. Estes valores estão dentro dos limites de segurança permitidos para uso de lasers (Zeimer *et al.* 1996).

Simultaneamente, o segmento anterior é iluminado por díodos infravermelhos e a imagem da íris é capturada numa câmara de vídeo, através de uma lente, por um espelho. Esta imagem visualizada no monitor permite ao operador fazer a focagem na pupila e a sua centragem garante uma distância constante entre o instrumento e o olho, bem como a entrada correta do feixe laser dentro do olho, através da pupila.

Uma lâmpada incandescente ilumina o plano focal conjugado do fundo ocular. Nesse plano, é colocado um *écran* com múltiplos pontos de fixação que são vistos pelo examinado. Esta luz fornece também iluminação para o fundo do olho cuja imagem obtida é captada por outra câmara de vídeo, própria para o fundo ocular, com 60º de

campo, imagem essa que para além de estar a ser visualizada no monitor é guardada após cada aquisição. Esta imagem permite ao operador verificar a fixação, observar a localização de zonas de interesse que possam existir e ajudar na interpretação dos resultados, bem como documentar a localização de cada varrimento no fundo ocular.

Para cobrir os 20º centrais, são obtidos 9 varrimentos que correspondem a cada um dos 9 diferentes pontos que o examinado tem que fixar ao longo de cada exame.

O exame é realizado sob midríase pupilar, e os indivíduos estão colocados em frente ao aparelho, semelhante a uma lâmpada de fenda. O operador usa um botão para alinhar a pupila e o examinado deve fixar cada um dos 9 pontos. Para cada um deles o operador foca e centra na pupila antes de ativar a aquisição. A aquisição decorre durante 200 ms e permite obter os 10 cortes óticos e a imagem do fundo ocular que corresponde a cada uma das 9 áreas. Imediatamente após cada varrimento os 10 cortes são visualizados no monitor e, se adequados, gravados no computador. Segue-se o mesmo procedimento até completar as 9 áreas. Os varrimentos seguintes são supostamente obtidos com menor intervalo de tempo entre eles, já que não é necessário voltar a focar a imagem (Zeimer *et al.* 1996). Figura 4

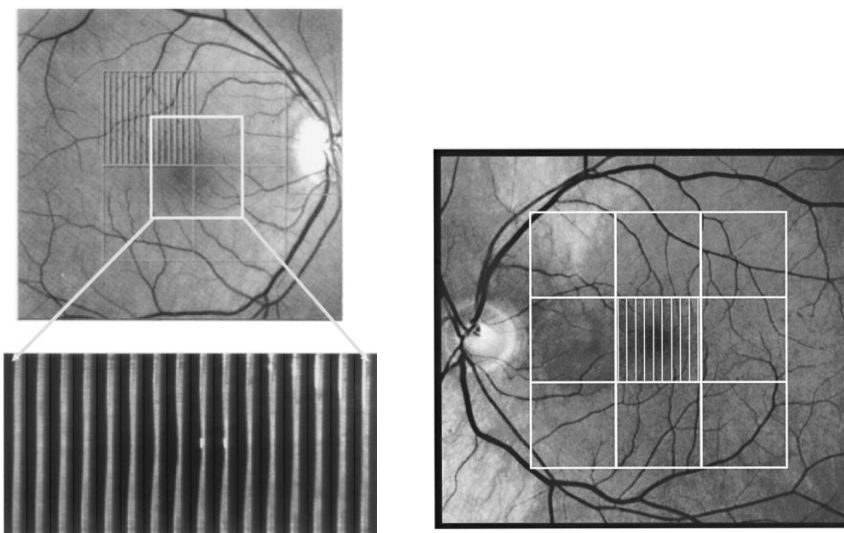


Figura 4. RTA.

Padrão de mapeamento macular do RTA (esquerda) (Polito *et al.* 2002), e as 9 áreas da retina que são analisadas com o RTA (direita); as linhas verticais ilustram os 10 cortes óticos que são efetuados (Asrani *et al.* 1999).

#### 4.6.2.3. Espessura da Retina

A análise da espessura da retina é realizada automaticamente, com um algoritmo. Divide cada corte ótico em 10 segmentos de 100  $\mu\text{m}$  de comprimento e converte cada um deles num perfil de intensidade de luz. Em cada segmento é detetada a localização das interfaces ao nível da membrana limitante interna e EPR. Uma correspondência com uma curva bi-Lorentzian é realizada para delinear a separação entre a membrana limitante interna e o EPR, que corresponde à espessura da retina. A análise é realizada ao longo de cada um dos segmentos dos 10 cortes óticos, dando origem a um conjunto de 10X10 valores de espessura, designados individualmente como *thixel* (*thixel* = elemento de espessura). A depressão foveal é detetada automaticamente ao identificar na área macular central o *thixel* com o menor valor. O *software* do sistema elimina automaticamente os pontos que se desviam dos que os rodeiam. Habitualmente esses grandes desvios devem-se a vasos sanguíneos de maior calibre ou lesões como exsudatos ou hemorragias que provocam uma sombra no EPR. Os pontos que são eliminados aparecem indicados no mapa final.

Os nove mapas, correspondentes às 9 áreas submetidas ao varrimento, são conjugados para formar um mapa de espessura da retina no polo posterior.

Em resumo: são obtidos valores de espessura da retina em 9 campos, numa área de 6000X6000  $\mu\text{m}$  (6X6 mm), referentes aos 20º centrais do polo posterior, centrados à fóvea. Cada um dos 9 campos é composto por 10 cortes óticos da retina, separados 200  $\mu\text{m}$ , numa área de 200X200  $\mu\text{m}$ , obtidos em 200 ms. Os valores numéricos de espessura da retina podem ser transformados num mapa de cores, que pode ser apresentado em 2 ou 3 dimensões.

#### 4.6.2.4. Resolução Axial e Reprodutibilidade

*In vitro*, num modelo de olho, a precisão axial foi determinada como sendo entre 5 a 10  $\mu\text{m}$  e a resolução axial de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  (Zeimer *et al.* 1996).

A reprodutibilidade consiste na variação das medidas realizadas consecutivamente no mesmo indivíduo num curto intervalo de tempo, e é um parâmetro fundamental em qualquer método quantitativo.

A reprodutibilidade intravisita (3 medições realizadas no mesmo dia) foi de  $\pm 11.5$   $\mu\text{m}$  para cada *thixel* e a reprodutibilidade intervisita (medições em 3 visitas diferentes) foi de  $\pm 13$   $\mu\text{m}$  para cada *thixel* (Zeimer *et al.* 1996). Estes valores de reprodutibilidade têm relevância clínica, significando que pode ser detetada uma alteração da espessura de 26  $\mu\text{m}$  com 97.5% de confiança.

Landau *et al.* mediram a espessura da fóvea em 50 olhos de 31 indivíduos saudáveis com o RTA. Obtiveram um valor médio de espessura na fóvea de  $178 \pm 44$   $\mu\text{m}$  e constataram uma reprodutibilidade intravisita de  $\pm 5.9\%$ , correspondendo a  $\pm 10.6$   $\mu\text{m}$ , e uma reprodutibilidade intervisita de  $\pm 6.6\%$ , correspondendo a  $\pm 10.8$   $\mu\text{m}$  (Landau *et al.* 1997).

Num grupo de 272 olhos de 272 indivíduos chineses avaliados com o RTA, Zou *et al.* observaram uma reprodutibilidade intravisita e intervisita de 0.95 e 0.88, respetivamente, e um valor médio de espessura da foveola e fóvea de 147.6 e 160.0  $\mu\text{m}$ , respetivamente (Zou *et al.* 2006).

#### **4.6.2.5. Espessura da Retina e Comparação RTA versus OCT**

##### **Grupos Normais**

Alguns estudos determinaram a espessura da fóvea com o OCT e o RTA e concluíram que ambos os métodos são reprodutíveis na quantificação da espessura da retina na fóvea (Konno *et al.* 2001; Koozekanani *et al.* 2000; Neubauer *et al.* 2001; Paunescu *et al.* 2004).

Asrani *et al.* (1999) avaliaram 29 olhos de 29 indivíduos saudáveis, com média de idades de  $48 \pm 16.6$  anos e criaram um mapa de espessura da retina normal, que se correlacionava com a normal anatomia da retina, no qual a espessura média na fóvea



foi de  $167 \pm 23 \mu\text{m}$  (Asrani *et al.* 1999). Não encontraram influência significativa da idade, sexo ou raça nos valores da espessura da retina; porém observaram uma tendência (não significativa) de aumento da espessura da retina em indivíduos de raça branca, comparada com raça negra, e nos homens, quando comparados com as mulheres. Neste estudo, os autores mostraram que o RTA pode detetar um aumento da espessura equivalente a 13% da espessura da retina com uma confiança de 97.5%, ou seja, o sistema permite a deteção precoce do edema macular. Landau *et al.* (N = 50) obtiveram um valor médio de espessura na fóvea de  $178 \pm 44 \mu\text{m}$  (Landau *et al.* 1997) e no grupo de Zou *et al.* (N = 272 olhos) foram observados valores de espessura da foveola e fóvea de 147.6 e 160.0  $\mu\text{m}$ , respetivamente (Zou *et al.* 2006).

Konno *et al.* (2001) avaliaram a reprodutibilidade da medição da espessura da retina em indivíduos normais com o OCT e o RTA, e compararam os resultados. A média da espessura da fóvea com o OCT foi de  $155.1 \pm 14.9 \mu\text{m}$  e com o RTA foi de  $107.8 \pm 18.6 \mu\text{m}$ , com um coeficiente de correlação para o mesmo operador entre as 2 sessões de 0.99 e 0.78, para o OCT, e de 0.89 e 0.99, para o RTA. Concluíram que ambos os sistemas são reprodutíveis, e que as medições obtidas com os 2 métodos se correlacionam significativamente (Konno *et al.* 2001).

Em 2008, Tangelder *et al.* avaliaram medições de espessura da retina em indivíduos normais, com o OCT e o RTA, tendo encontrado valores de espessura na fóvea de  $193 \pm 17 \mu\text{m}$  com o OCT, e  $134 \pm 14 \mu\text{m}$  com o RTA (Tangelder *et al.* 2008).

### **Fases iniciais da RD/EMD**

Em 1991, Shahidi *et al.* avaliaram 19 doentes com EMD e compararam as medições realizadas com o RTA com os achados da biomicroscopia com lâmpada de fenda e da classificação das fotografias a cores do fundo ocular com estereopsia. A observação clínica e fotográfica detetou 80% e 78%, respetivamente, das áreas com espessamento da retina no RTA, mas não detetaram áreas com médias de espessura 1.5 e 1.6 vezes o normal, respetivamente, o que salientou a importância da avaliação quantitativa do EMD por um método quantitativo (Shahidi *et al.* 1991). Os autores

concluíram que os métodos clínico e fotográfico não são fidedignos para detetar um aumento da espessura por edema quando este é inferior a 60% da espessura da retina, o que mais tarde foi confirmado pelos achados de outros autores e do nosso grupo de investigação (Yasukawa *et al.* 1998; Tsujikawa *et al.* 1999; Pires *et al.* 2002).

Guan *et al.* analisaram 17 olhos de 17 indivíduos diabéticos com EMD, classificado nas fotografia a cores do fundo ocular com estereopsia. Quando comparado com a avaliação fotográfica, o RTA teve uma sensibilidade de 57% e uma especificidade de 71% (Guan *et al.* 2004).

Um trabalho realizado no Brasil, em 2009, e que utilizou o RTA para medir a espessura da retina, reportou um aumento da espessura da fóvea em indivíduos com DM tipo 2 e lesões no fundo ocular de RDNP, mas sem EMCS, quando comparado com o grupo controlo ( $198.9 \pm 48.3 \mu\text{m}$  versus  $147.4 \pm 15.4 \mu\text{m}$ , respetivamente). Não encontraram diferenças na espessura da retina entre os 2 sexos, ou correlação entre a espessura da retina e a duração da doença. Este estudo salientou a capacidade do RTA na deteção precoce do EMD e denominou-o EMD subclínico (Ramalho *et al.* 2009).

Neubauer *et al.* (2001) avaliaram a reprodutibilidade da medição da espessura da retina com o OCT e o RTA em indivíduos normais e com edema da retina de várias origens, incluindo EMD (Neubauer *et al.* 2001). Nos olhos normais, a espessura da fóvea foi de  $153 \mu\text{m}$  com o OCT e  $181 \mu\text{m}$  com o RTA, com coeficientes de variação no mesmo indivíduo de 9%, com o OCT, e 7%, com o RTA, quando repetidas as medições 5 vezes. Em olhos com edema, o OCT mediu em média  $324 \mu\text{m}$  e o RTA em média  $403 \mu\text{m}$ . Concluíram que ambos os métodos adquirem medições reprodutíveis da espessura da fóvea em indivíduos normais e com edema da retina, embora as medições com o RTA pudessem ser “falsamente” elevadas. Num grupo idêntico de indivíduos, com edema macular de diferentes etiologias, Polito *et al.* compararam os 2 métodos e observaram uma forte correlação entre as medições de espessura na fóvea e foveola ( $\kappa=0.89$  e  $\kappa=0.94$ , respetivamente) (Polito *et al.* 2002). Contrariamente, em 2008, Tangelder *et al.* avaliaram medições de espessura da retina em indivíduos

normais e diabéticos, com e sem edema macular, com o OCT e o RTA, e encontraram valores de espessura da retina em todas as áreas significativamente superiores com o OCT do que com o RTA. As suas observações permitiram-lhes concluir que o OCT é mais preciso que o RTA na medição da espessura da retina.

Para comparar os sistemas OCT e RTA realizámos um estudo em que usámos os 2 métodos para medir a espessura da retina em indivíduos saudáveis e diabéticos, com DM tipo 2 e lesões de RDNP ligeira, sem edema macular, na observação clínica e nas fotografia a cores do fundo ocular (Pires *et al.* 2002). Foram incluídos neste estudo 28 doentes com diagnóstico estabelecido de DM tipo 2, 10 homens e 18 mulheres, com idade média de  $59.2 \pm 5.4$  anos (variação 50 - 69), duração média de diabetes de  $7.9 \pm 4.8$  anos (variação 1 - 20), valor médio de HbA1c de  $7.3 \pm 1.5\%$  (variação 5.5% - 11,7%) e valores de pressão arterial inferiores a 155/85 mm Hg. No exame oftalmológico apresentavam uma AV média de 20/20, e ausência de edema macular na observação do fundo ocular na lâmpada de fenda, com uma lente de não-contacto de +90 dioptrias ou lente de contacto. Foram adquiridos pares de fotografias a cores do fundo ocular nos 7 campos padrão, tal como definido pelo ETDRS, com uma câmara de 30º, classificadas de acordo com o protocolo do ETDRS, uma modificação da classificação de Arlie House (ETDRS 1991e): 36% dos olhos não tinham lesões de RD, nível 10 de RD, e 64% apresentavam nível 20/35 (RDNP ligeira). Foi incluído apenas 1 olho de cada doente. A espessura da retina foi obtida na mesma sessão, sequencialmente, com o OCT (versão A6.2, Zeiss Humphrey Systems) e com o RTA (versão 2.11 e análise 6.35, Talia Technology LTD.).

Adicionalmente, foram incluídas 2 populações diferentes de indivíduos saudáveis, para servir como controlo para o RTA (N = 14, idade média de 48 anos, variando entre 42 e 55 anos, média de espessura macular central  $141 \pm 18 \mu\text{m}$ ) e para o OCT (N = 10, idade média de 56 anos, variando entre 43 e 68 anos, média de espessura macular central  $187 \pm 16 \mu\text{m}$ ), com AV de 20/20 e restante exame oftalmológico normal. Foram elaborados mapas de espessura da retina normal na área macular (mapas referência),

calculados em 5 áreas na área macular central, com base no valor médio medido em cada localização adicionado de 2 desvios padrão.

O OCT foi realizado no grupo controlo e no grupo de estudo usando o padrão de 6 linhas radiárias, com 3.45 mm de comprimento, e que passam no ponto de fixação, tal como descrito por Hee *et al.* (Hee *et al.* 1998). As medições foram obtidas pelo *software* do aparelho, sem correção manual, em 5 localizações: área central em disco com 1000 µm de diâmetro (que se assumiu corresponder à fóvea) e 4 áreas no anel parafoveal, com 1 - 3 mm de diâmetro, em 4 quadrantes (papilomacular, superior, temporal e inferior). O RTA foi realizado no grupo controlo correspondente e no grupo de estudo, pelo mesmo operador, tendo os valores de espessura da retina fornecidos pelo sistema sido extraídos e matematicamente transformados, de forma a produzir um mapa de espessura da retina sobreponível e comparável ao do OCT (Pires *et al.* 2002).

O RTA detetou áreas com aumento da espessura dispersas na mácula (frequentemente em mais do que uma localização), quando comparadas com o respetivo mapa de espessura da retina normal, em 24 de 28 olhos/doentes (86% dos olhos), com valores de aumento que variaram entre 0.3% a 73.5% acima do valor referência; o OCT detetou aumento da espessura da fóvea em 3 olhos/doentes (11% dos olhos), que variou entre 0.3 a 4.8% acima do valor referência. O aumento da espessura da retina não se correlacionou com a duração da diabetes ou com o controlo metabólico, avaliado pelo nível da HbA1c.

Neste estudo, o RTA e o OCT detetaram áreas na retina macular central com aumento da espessura, ou seja, acima dos valores referência calculados em indivíduos saudáveis com base no valor médio adicionado de 2 desvios padrão, num grupo de indivíduos diabéticos sem lesões de RD ou com lesões de RDNP ligeira, sem edema macular no exame clínico. O RTA identificou aumentos mais frequentemente que o OCT, o que sugeriu a sua maior sensibilidade na deteção precoce do EMD. Estes resultados demonstram que o edema macular localizado, consequência da rutura da

BHR, é uma das alterações mais precoces na retina dos diabéticos tipo 2. Adicionalmente, neste estudo, os aumentos observados com o RTA variaram com o nível de RD: em olhos com nível 10 o aumento máximo foi de 19.2%, enquanto no nível 20/35 os aumentos chegaram a 56.5% e 73.5%. Ou seja, estes resultados também mostram que o aumento da espessura da retina por edema está associado a progressão das alterações microvasculares retinianas. Por outro lado, foi também aparente que o desenvolvimento de áreas de edema não é um achado universal, pois cerca de 14% dos olhos/doentes, níveis 10, 20 e 35, não tinham edema nos métodos objetivos.

Desta comparação pudemos concluir que o RTA foi mais sensível que o OCT para detetar alterações da espessura da retina quando estas são mínimas, ou seja, nas fases iniciais da RD, em olhos sem opacidade dos meios e na ausência de alterações morfológicas intrarretinianas, como os exsudatos duros. De notar que, neste estudo, foi usado um sistema de OCT de primeira geração.

A nossa experiência clínica com o RTA também mostrou que outra vantagem do RTA era a sua rapidez de aquisição, em 200 ms. Esta característica associava-se a menor desconforto para o doente devido a exposição menos prolongada à luz, facilitando ao doente manter a fixação ocular e evitar o pestanejo.

Por outro lado, em fases mais avançadas de RD, os resultados obtidos com o RTA parecem ser afetados pela presença de exsudatos duros acumulados na retina e pela interferência pelas opacidades dos meios, tal como a catarata. O RTA pareceu, pois, particularmente útil para detetar alterações localizadas e mínimas, nas fases iniciais da RD, antes do desenvolvimento de edema macular, quando uma intervenção terapêutica pode ser mais eficaz, evitando a progressão para fases mais avançadas de edema da retina.

Posteriormente, em 2006, Goebel *et al.* analisaram com o OCT e com o RTA 124 olhos de indivíduos diabéticos com vários níveis de RD, 64 dos quais com diagnóstico clínico/fotográfico de EMCS (Goebel & Franke 2006). Constataram uma correlação

moderada entre os 2 métodos ( $r=0.66$ ), melhor na fóvea ( $r=0.82$ ) e, em geral, a correlação com as fotografias a cores do fundo ocular foi melhor com o OCT ( $r=0.77$ ), do que com o RTA ( $r=0.62$ ). A sensibilidade para detetar EMCS foi maior com o OCT, enquanto o RTA mostrou maior especificidade. No entanto, é de salientar que as baixas especificidades que observaram, sobretudo com o OCT, mas também com o RTA, embora em menor extensão, poderão efetivamente corresponder a olhos com EMD subclínico, não detetado nas fotografias a cores do fundo ocular. Os valores absolutos de espessura foram maiores com o OCT do que com o RTA. A deteção de aumento da espessura da retina, em qualquer uma das 9 áreas, na ausência de edema na mácula nas fotografias a cores do fundo ocular, estava presente no OCT em 14 olhos, e no RTA em 7 olhos. Os autores consideraram que o algoritmo do RTA se pode tornar menos exato com o aumento da espessura da retina, devido a uma possível atenuação do sinal do EPR. Os resultados deste estudo estão em aparente discordância com os nossos. No entanto, os autores também constataram que os grupos estudados são diferentes quanto aos níveis de RD e que, no seu grupo de estudo, quando analisados olhos clinicamente sem edema, os resultados eram idênticos aos por nós observados. Concluíram, então, que o OCT apresenta excelente sensibilidade e considerável especificidade, pelo que o recomendam para *screening* do EMD. O RTA estará mais apropriado para a deteção de edema macular nas fases iniciais (EMD subclínico) ou para confirmar a indicação para laser, em doentes sem opacidades significativas dos meios e sem RD avançada, confirmando as nossas observações prévias (Goebel & Franke 2006).

### **4.6.3. OCT**

#### **4.6.3.1. Introdução**

O OCT foi introduzido em 1991 por Huang *et al.* para visualizar secções óticas dos tecidos biológicos (Huang *et al.* 1991), rapidamente adaptado para a visualização *in vivo* da retina (Swanson *et al.* 1993). Desde então, o OCT aumentou dramaticamente a nossa compreensão das alterações morfológicas associadas a muitas doenças oculares, incluindo o EMD. As imagens em secção do OCT foram correlacionadas com a

histologia da retina (Toth *et al.* 1997; Hee, Izatt, *et al.* 1995), visualizadas *in vivo* e em tempo real.

O OCT tem várias vantagens. Permite a imagiologia da órbita posterior com alta resolução, onde, por exemplo, os ultrassons estão limitados por atenuação do sinal (Hee, Izatt, *et al.* 1995); aquisição rápida da imagem, e é um método não invasivo, que não requer contacto com o olho.

Desde a primeira geração dos sistemas de OCT até à atualidade, progressivas melhorias em termos de instrumentação têm sido implementadas, tornando este método como um método de eleição na prática clínica diária e em investigação. Nas últimas duas décadas, o OCT tem permitido a análise estrutural da retina, nervo ótico, coroideia e interface vitreomacular, e realizar medições da espessura da retina com elevada precisão e reprodutibilidade (Krzystolik *et al.* 2007; Paunescu *et al.* 2004; Polito *et al.* 2005; Menke, Dabov, Knecht, *et al.* 2009). A recente evolução da técnica, o sistema de OCT de domínio espectral, permitiu aumentar a resolução, aquisição mais rápida, e registo da imagem e imagiologia a 3-dimensões. É agora possível o exame das várias camadas celulares que constituem a retina neurosensorial e a retina externa, no complexo entre os fotorreceptores e o EPR.

No EMD, o OCT quantifica objetivamente a espessura da retina, sendo a espessura da retina na área macular central o parâmetro do OCT mais usado para caracterizar o EMD com envolvimento do centro, e que se correlaciona com a AV. Adicionalmente, permite avaliar a morfologia da retina, quanto à presença de cavidades cistoides, deteção de fluido subretiniano, avaliação de doenças da interface vitreomacular (adesão/tração vitreomacular, buraco macular) e, mais recentemente, medir a espessura da coroideia. No EMD tem particular relevância no diagnóstico, seguimento, decisão terapêutica e avaliação do impacto de modalidades terapêuticas, estabelecidas ou em investigação. O uso do OCT, em particular dos recentes sistemas de domínio espectral, tem contribuído para a aquisição de novos conhecimentos fisiopatológicos no EMD.

#### 4.6.3.2. Princípios do OCT – Sistema *Time - Domain*

O princípio operativo do OCT é baseado na interferometria de baixa coerência ótica, que mede o atraso da luz refletida nas diferentes estruturas oculares. Por esta razão, os sistemas de OCT padrão denominam-se também *Time-domain* (TD).

O aparelho OCT é semelhante a uma câmara de fundo ocular. É constituído por uma objetiva de elevada ampliação, usada para focar a imagem da retina, ligada a uma câmara de vídeo que permite ao operador ver o fundo ocular e a localização precisa onde a imagem do OCT está a ser adquirida. A imagem do fundo ocular observada no vídeo é gravada. O ponto de fixação do doente pode ser interno, e ajustado pelo operador, para o olho que está a ser examinado, ou ser um ponto de fixação externo, para o olho contralateral.

O OCT Stratus, a terceira geração de OCT TD, utiliza uma luz com comprimento de onda de 820 nm, situada na zona do espectro no infravermelho, minimamente visível para o doente, um sistema de fibras óticas e uma lente de +78 dioptrias. Um díodo superluminescente é utilizado como fonte de luz de baixa coerência. O feixe de luz infravermelho emitido é dividido num interferómetro por uma lâmina separadora em 2 feixes, que se dirigem, respetivamente, às estruturas oculares, e a um espelho de referência, que se move. O feixe de luz que entra no olho é refletido nos limites dos tecidos com propriedades óticas diferentes, sendo composto por múltiplos ecos, mas é também dispersado e absorvido pelos tecidos; o feixe “referência” é refletido no espelho de referência, que se movimenta. Os feixes refletidos são recombinados num acoplador de fibra ótica (interferómetro) e comparados. A informação temporal contida no sinal de interferência entre os 2 feixes, ou seja, o atraso da luz refletida pelas estruturas oculares, é processada por *software* apropriado do sistema.

Perfis de refletividade longitudinal são gerados ao movimentar o espelho referência e simultaneamente registar a magnitude do sinal de interferência resultante. O sinal refletido por uma estrutura da retina só pode ser medido quando a distância do braço referência coincide com o comprimento de uma via refletida



através do olho. Obtêm-se assim os “ecos” de reflexão das diferentes estruturas retinianas, análogo a uma ecografia modo A. Forma-se, então, um *A-scan*. Imagens em secção da retina, bidimensionais (o *B-scan*), semelhantes a um corte histológico, são construídas ao combinar informação de perfis de refletividade longitudinal, obtidos pelo movimento repetitivo do espelho de referência, enquanto o outro feixe “percorre” a retina. Ou seja, grupos de *A-scans* compõem um *B-scan*. Quanto mais *A-scans* forem usados para formar um *B-scan*, maior a resolução do sistema, porque a distância entre os pontos analisados é menor.

O processamento digital corrige erros induzidos pelo movimento ocular, alinhando os *A-scans*, e melhorando a taxa sinal-ruído.

No OCT Stratus a resolução do sistema é de aproximadamente 8-10  $\mu\text{m}$  e a velocidade de aquisição é de 400 *A-scans* por segundo (Sull *et al.* 2010; Baskin 2010). A resolução axial é determinada pela propriedade da fonte de luz, conhecida como luz coerente, que é inversamente proporcional ao comprimento de onda da fonte de luz. Para melhorar a resolução axial são necessárias fontes de luz com uma distribuição de comprimentos de onda mais ampla (Srinivasan *et al.* 2006; Forte *et al.* 2009).

#### **4.6.3.3. Interpretação do OCT – Sistema *Time - Domain***

A interpretação do OCT consiste na análise qualitativa e quantitativa dos dados (Brancato & Lumbroso 2004; Schuman *et al.* 2004).

Primeiro, é necessário avaliar a qualidade dos *scans* do OCT, a intensidade do sinal, e a presença de eventuais artefactos. Os artefactos podem ser induzidos pelo operador, pelo indivíduo (alteração da fixação, pestanejo, movimentos oculares) ou por limitações inerentes à própria técnica. Estes artefactos causam uma alteração no desempenho da segmentação pelo *software* do aparelho, e podem levar a erro na medição automática da espessura da retina (Ho *et al.* 2009; Ray *et al.* 2005; Sadda, Wu, *et al.* 2006). Alguns estudos também salientaram que a perturbação da segmentação pode ocorrer em *scans* de boa qualidade, devido à própria patologia e

lesões associadas, como ocorre no buraco macular, no descolamento do EPR, quando existe fluido subretiniano, fibrose retiniana e exsudatos duros (Domalpally *et al.* 2009; Ho *et al.* 2009; Krebs *et al.* 2009; Sadda, Wu, *et al.* 2006). A presença de opacidades dos meios, como a catarata e o hemovítreo, e um sinal de baixa intensidade também podem alterar a segmentação da imagem e induzir erros. Existe a possibilidade da correção manual, mais demorada. Saliente-se, no entanto, que apenas 14% dos *scans* de OCT classificados no centro de leitura do DRCR.net, no âmbito de estudos em doentes com EMD, necessitaram de correção manual por erros de segmentação dos limites interno ou externo da retina (Browning, Glassman, *et al.* 2008).

### Análise Qualitativa

A análise qualitativa baseia-se na análise da morfologia e da refletividade do tecido da retina, e é bastante intuitiva. A refletividade da retina depende das suas propriedades óticas, ou seja, das variações no índice refrativo das estruturas celulares e na quantidade de sinal luminoso que é absorvido pelos tecidos (Brancato & Lumbroso 2004; Schuman *et al.* 2004). Figura 5

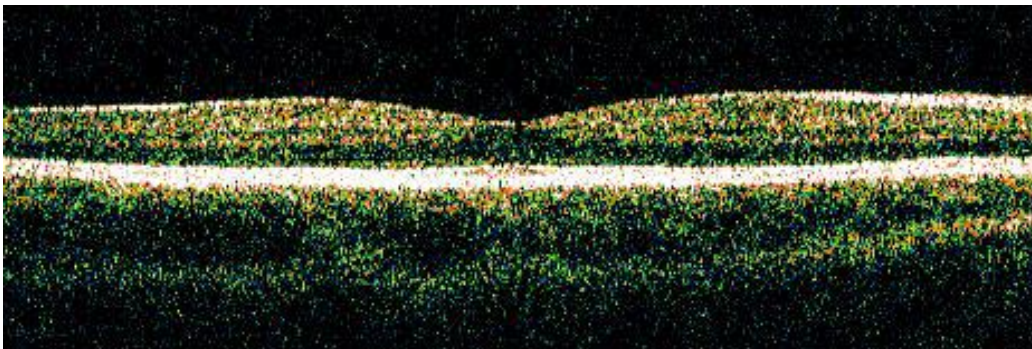


Figura 5. OCT Stratus TD. Imagem em secção (*B-scan*) obtida na área macular central de um indivíduo normal.

O perfil de refletividade das camadas da retina é representado nos *scans* do OCT Stratus numa escala colorida, de acordo com um código de “falsas” cores, na qual o vermelho/branco representam alta refletividade e o azul/preto representam baixa refletividade.

Quando se analisa um *scan* de uma retina normal, a primeira camada que surge é a membrana limitante interna, pelo contraste entre o vítreo, não refletivo e a retina refletiva. Atrás está a camada de fibras nervosas, altamente refletiva pela sua disposição horizontal, mais espessa na porção nasal, devido ao feixe papilo-macular. As camadas plexiformes, interna e externa, têm refletividade média. As camadas nucleares, como a camada de células ganglionares, camada nuclear interna e camada nuclear externa, têm baixa refletividade ótica. A camada de células ganglionares é mais espessa na área parafoveal. Na fóvea a retina é menos espessa, com ausência das camadas internas e aumento da camada nuclear externa, constituindo a depressão foveal, facilmente reconhecida. Na retina externa, ou seja, complexo fotorreceptores-EPR, o OCT TD Stratus deteta 2 linhas hiperrefletivas, que parecem corresponder, anatomicamente, à junção entre os segmentos internos e os segmentos externos dos fotorreceptores e ao EPR, respetivamente. O EPR é altamente refletivo, e constitui a camada mais externa da retina observada no OCT. Atrás está a coriocapilar, com refletividade intermédia. A interface hialoideia posterior pode ser visualizada como uma estrutura fina e hiperrefletiva na cavidade vítrea, a uma distância da superfície da retina, quando existe descolamento posterior do vítreo, completo ou incompleto. Neste último caso, podem ser aparentes aderências ao tecido retiniano perifoveal ou peripapilar (Gaucher *et al.* 2005). Quando um *scan* do OCT interseja um vaso sanguíneo da retina, este surge como uma estrutura de alta refletividade, com uma sombra posterior.

Outro aspeto da análise qualitativa dos *scans* consiste no exame morfológico, ou seja, avaliação do perfil retiniano - superfície e camadas posteriores, presença de estruturas anormais, e análise do perfil de refletividade – hiper, hipo e efeitos de sombra (Brancato & Lumbroso 2004).

Alterações patológicas no contorno da superfície da retina podem ser observadas como desaparecimento da depressão foveal, por exemplo no edema da retina, ou irregularidade da depressão foveal, por exemplo associada à presença de membrana epirretiniana, buraco lamelar ou buraco macular de toda a espessura.

Lesões hiperrefletivas podem corresponder a membranas epirretinianas, manchas algodinosas, exsudatos duros, hemorragias, membranas neovasculares coroideias, fibrose, hiperplasia do EPR. Lesões hiporrefletivas estão normalmente mais associadas à acumulação de fluido, como o edema da retina, que se pode associar ao aparecimento de cavidades cistoides hiporrefletivas intrarretinianas, ou a fluido subretiniano, visualizado pela presença de um espaço hiporrefletivo subretiniano. A atrofia da retina e do EPR, ou hipopigmentação do EPR, associam-se a hiporrefletividade tecidual, com aumento da refletividade da coroideia subjacente.

### **Análise Quantitativa**

A análise quantitativa é uma parte muito importante da interpretação do OCT. O OCT tornou possível a quantificação da espessura e volume da retina, e de uma variedade de outras estruturas, tornando a avaliação diagnóstica, de progressão temporal da doença e após tratamento objetivas.

O cálculo da espessura da retina depende de um algoritmo de processamento da imagem chamado segmentação, que identifica várias estruturas hiperrefletivas em cada *scan*, e delimita os bordos interno e externo da retina, entre os quais mede a espessura da retina. O OCT Stratus TD mede a espessura da retina entre a interface vitreoretiniana (bordo interno) e a linha de junção dos segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores (bordo externo) (Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009). Este sistema permite a correção manual da segmentação automática.

A espessura da retina e o volume são calculados automaticamente pelo *software* do aparelho, e são apresentados como valores numéricos numa tabela ou em mapas de espessura ou volume da retina, com um código de cores.

Convencionalmente, a mácula é “dividida” em 9 campos, tipo-ETDRS (ETDRS 1991c), compreendidos em 3 círculos concêntricos, com diâmetros de 1000, 3000 e 6000  $\mu\text{m}$ . O círculo interno tem um diâmetro de 1000  $\mu\text{m}$ , e corresponde ao campo macular central, e a média da espessura da retina nesta área central será referida,

daqui em diante, como *central subfield thickness* (CST), para uniformização de nomenclatura com o que se encontra na literatura. O *software* do sistema Stratus fornece, também, um valor de espessura da retina no ponto central da fóvea, denominado como *central point thickness* (CPT), que corresponde ao valor médio no ponto de interseção dos 6 *scans* radiários obtidos com o protocolo de aquisição *fast macular thickness*. Os valores de CST, ou seja, a espessura média no campo macular central (área com 1000  $\mu\text{m}$  de diâmetro), mas também o valor de espessura no ponto central na fóvea (CPT), em menor extensão, são valores particularmente relevantes e usados na avaliação do EMD na prática clínica e em investigação, pela associação com a AV central.

No mapa de espessura da retina observam-se, para além do campo macular central, 2 áreas em anel, concêntricas com o campo central; o anel interno, situado entre 1000 e 3000  $\mu\text{m}$ , e o anel externo, entre 3000 e 6000  $\mu\text{m}$ . Os anéis interno e externo são, por sua vez, divididos em 4 subcampos (nasal, superior, temporal e inferior). Figura 6 e 7

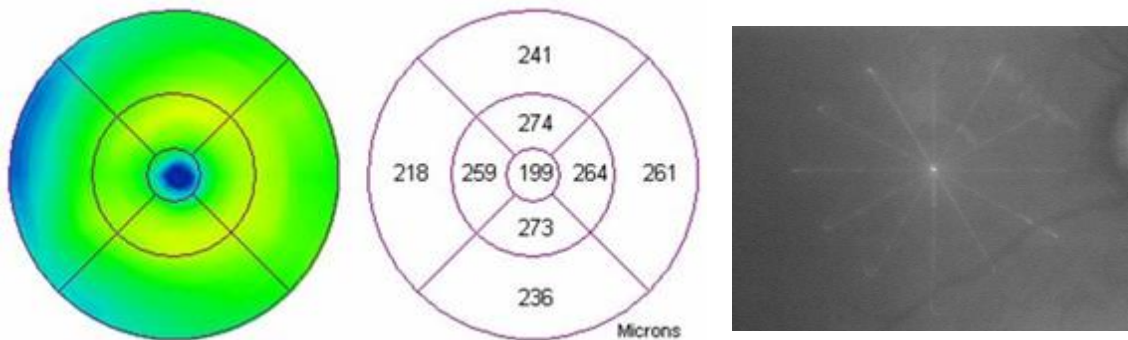


Figura 6. OCT Stratus TD, indivíduo normal.

Mapa de espessura da retina obtido num indivíduo normal: representação a cores (à esquerda), numérica (ao meio), padrão de 6 *scans* radiários do *fast macular thickness protocol* (à direita). Note-se os valores de espessura da retina no campo macular central (199  $\mu\text{m}$ ), e nas 4 áreas (nasal, superior, temporal e inferior) em que se subdividem o anel interno e o anel externo: no anel interno (264, 274, 259 e 273  $\mu\text{m}$ , respetivamente), e no anel externo (261, 241, 218 e 236  $\mu\text{m}$ , respetivamente).

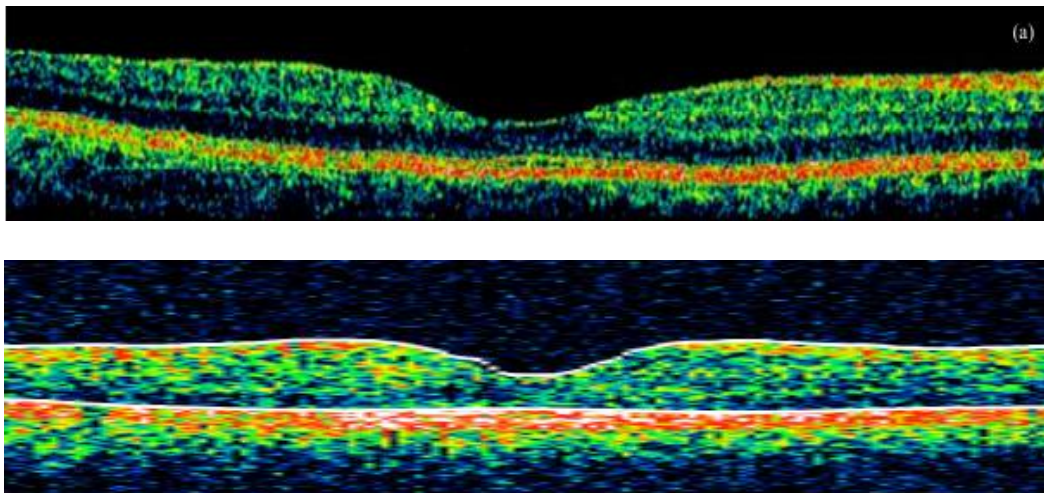


Figura 7. OCT Stratus TD, indivíduo normal.

Em cima: *B-scan*. Em baixo: *B-scan* com a segmentação pelo *software* do sistema, ao nível da interface vitreorretiniana (bordo interno) e da linha de junção dos segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores (bordo externo).

No mapa de espessura da retina normal, com o OCT Stratus, os valores de espessura da retina têm o menor valor no campo macular central, aumentam no anel interno, e depois diminuem ligeiramente no anel externo, consistentes com a anatomia macular normal (Chan *et al.* 2006; Legarreta *et al.* 2008; Grover *et al.* 2010).

O OCT Stratus tem diferentes protocolos para aquisição das imagens da retina e do disco ótico. Nos protocolos *fast* cada *B-scan* é composto por 128 *A-scans*; nos protocolos *standard* cada *B-scan* é composto por 512 *A-scans*, mas o tempo de aquisição aumenta e a reprodutibilidade diminui. Apenas os protocolos *fast* podem ser relacionados com a base normativa do aparelho, pelo que são preferencialmente usados nas avaliações quantitativas. Os *scans* de alta resolução são mais usados para avaliação morfológica. Assim, para determinação da espessura da retina na área macular com o OCT Stratus usa-se normalmente o protocolo *fast macular thickness*, que utiliza um padrão de 6 linhas radiárias, com 6 mm de comprimento, centradas na fóvea, com orientação angular de 30° entre elas. Cada linha consiste em 128 *A-scans*, então a espessura da retina é medida por um total de 768 *A-scans* (6X128=768 *A-scans*) para produzir um mapa de espessura da retina na mácula com diâmetro de 6 mm. Esta característica diminui o tempo total de aquisição (cerca de 1.92 segundos),

mas sacrifica a resolução. Como a densidade dos pontos medidos depende da distância ao centro, apenas as medições na área macular central, com diâmetro de 1000  $\mu\text{m}$ , são baseadas num número suficiente de *A-scans*. A “interpolação” da espessura da retina entre os 6 *scans* aumenta com a excentricidade, e pode, de facto, falhar áreas com alteração da espessura (Browning & Fraser 2005; Legarreta *et al.* 2008). Sadda *et al.* desenvolveram um algoritmo para segmentar e quantificar áreas de espessamento da retina automaticamente, baseando-se num protocolo de aquisição circular (em vez de radiário), que se correlacionava bem com a avaliação clínica e com o protocolo de aquisição radiário do OCT (Sadda, Tan, *et al.* 2006).

Na literatura podemos encontrar diferentes medições da espessura da retina em grupos de indivíduos normais (valores médios), o que pode refletir certas características específicas e a composição das populações estudadas relativamente à idade, sexo, raça, refração.

Não existe consenso quanto à variação da espessura da retina com a idade. Alguns autores não encontraram correlação entre a espessura da retina e a idade (Browning, Fraser & Clark 2008; Chan *et al.* 2006; Grover *et al.* 2010; Hee, Puliafito, *et al.* 1995; Massin *et al.* 2002; Sánchez-Tocino *et al.* 2002), enquanto outros encontraram uma correlação negativa entre a espessura e a idade, observada nas 9 regiões do mapa de espessura macular (Alamouti & Funk 2003; Eriksson & Alm 2009).

Também tem sido reportado em alguns estudos que os homens têm retinas mais espessas que as mulheres (Browning, Fraser & Clark 2008; Guedes *et al.* 2003; Hee, Puliafito, *et al.* 1995; Kelty *et al.* 2008; Massin *et al.* 2002; Wong *et al.* 2005). Contrariamente, Chan *et al.* e Grover *et al.* não encontraram diferenças entre os dois sexos (Chan *et al.* 2006; Grover *et al.* 2010). A espessura da retina também pode variar com a etnicidade. Aparentemente, grupos de indivíduos de raça negra e asiáticos têm valores de CST menores do que indivíduos brancos com idades idênticas (Asefzadeh *et al.* 2007; Guedes *et al.* 2003; Kelty *et al.* 2008; Kashani *et al.* 2010). Contrariamente, Oshitari *et al.* encontraram aumento da espessura macular e da camada de fibras

nervosas em indivíduos japoneses, com o OCT Stratus, salientando a importância da diferença racial nas medições da espessura da retina (Oshitari *et al.* 2007). A espessura macular também pode estar correlacionada com o comprimento axial (Wong *et al.* 2005) e a presença de alta miopia. Wu *et al.* encontraram, em indivíduos com alta miopia, definida como um equivalente esférico superior a 6 dioptrias, um aumento da espessura na fóvea, mas diminuição nos anéis interno e externo do mapa macular (Wu *et al.* 2008). Ou seja, embora não seja consensual entre autores, a idade, o sexo e a alta miopia devem ser tidos em consideração quando se interpretam valores de espessura da retina e na inclusão de doentes em estudos clínicos.

A criação de bases normativas, constituídas por médias de valores de espessura da retina obtidos em indivíduos saudáveis com exame oftalmológico “normal” é de enorme relevância, para a prática clínica e investigação. É fundamental para o desenho dos ensaios clínicos, no que diz respeito, por exemplo, aos critérios de elegibilidade e de tratamento, e, em geral, para a uniformização de critérios entre observadores diferentes, na detecção/confirmação da presença de alteração e, portanto, de doença.

É sobre estes valores “referência” que se pode presumir uma alteração da espessura da retina: aumento da espessura, traduzindo edema, ou a sua diminuição, traduzindo degeneração.

A detecção de alteração, aumento ou diminuição, da espessura da retina pode ser feita pela comparação com o valor médio normal adicionado/subtraído de 2 desvios padrão, medido na mesma localização (Massin *et al.* 2002), ou, simplesmente, comparando com o valor normal (Browning & Fraser 2005).

Para estabelecer uma base normativa com o OCT Stratus no nosso centro, observámos 28 voluntários saudáveis, 11 homens e 17 mulheres, com uma média de idade de  $53.4 \pm 8.7$  anos (variação 40 - 77 anos) (Pires, Santos, Nunes & Lobo 2013). Estes indivíduos apresentavam um exame oftalmológico normal, com uma AV média de 20/20, refração com equivalente esférico inferior a 3 dioptrias, e, na fundoscopia, ausência de alterações maculares ou no disco ótico. A espessura da retina na área



macular foi medida com o OCT Stratus, versão 4, usando o protocolo de aquisição *fast macular thickness*, pelo mesmo operador, familiar com o sistema de OCT, em todos os indivíduos. Obtiveram-se valores médios de espessura da retina e desvio padrão (DP) para o CPT e CST de  $171.3 \pm 20 \mu\text{m}$  e  $201.4 \pm 21.8 \mu\text{m}$ , respetivamente, não se tendo observado diferença significativa entre o sexo masculino e feminino (Pires, Santos, Nunes & Lobo 2013). Estabeleceram-se valores referência de espessura da retina no ponto central (CPT) e no campo macular central (área central com  $1000 \mu\text{m}$ ), isto é CST, com base no cálculo do valor médio subtraído e adicionado de 2 DP. Assim, os valores referência calculados de CPT e CST situam-se, respetivamente, entre  $130 - 210 \mu\text{m}$  e  $160 - 240 \mu\text{m}$ . Ou seja, um valor de CST superior a  $240 \mu\text{m}$ , obtido com o OCT Stratus, está claramente aumentado, isto é, 2 DP acima do valor médio normal, e poderá ser considerado um indicador de aumento da espessura da retina macular central e, portanto, de edema. Efetivamente, um valor de espessura da retina macular central (diâmetro de  $1000 \mu\text{m}$ )  $\geq 250 \mu\text{m}$ , obtido com os sistemas de OCT Stratus TD, tem sido considerado como critério de inclusão, tratamento e re-tratamento em vários estudos clínicos em doentes com EMD (Do *et al.* 2013; Lam *et al.* 2007), e em protocolos do DRCR.net (Browning *et al.* 2007; Elman *et al.* 2010; S. B. Bressler *et al.* 2012; Davis *et al.* 2008; Chew *et al.* 2007). Por outro lado, o limite superior de espessura no ponto central da fóvea (CPT), valor médio + 2 DP, calculado neste grupo de indivíduos normais, foi de  $210 \mu\text{m}$ , valor acima do qual o edema macular é considerado. De facto, como à frente neste texto se verá, o limiar inferior da definição de EMD subclínico do DRCR.net,  $225 \mu\text{m}$  com o OCT Stratus (N. M. Bressler *et al.* 2012), que adotámos no nosso estudo observacional de EMD subclínico, está de acordo, também, com as nossas observações num grupo normal.

No quadro 1 encontram-se valores de espessura da retina obtidos em populações normais com o OCT Stratus na área macular central, por diferentes autores, incluindo o nosso grupo de investigação. Mostra-se o valor médio da espessura da retina e DP, e respetivo intervalo de referência, calculado com base na média  $\pm 2$  DP, no ponto de interseção dos 6 *scans* radiários (CPT) e na área central com diâmetro de  $1000 \mu\text{m}$  (CST). Globalmente, com base nestes valores, verifica-se que, com o OCT Stratus, os

valores referência de espessura da retina na área macular central variam entre um valor mínimo e máximo, respetivamente, de 118 e 230  $\mu\text{m}$ , no ponto central da fóvea (CPT), e entre 160 e 252  $\mu\text{m}$ , na área macular central (CST).

Os valores que calculámos numa população normal são concordantes com os valores reportados por outros autores (Chan *et al.* 2006; Browning, Fraser & Clark 2008; Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009; Grover *et al.* 2010; Kashani *et al.* 2010).

Assim, o uso do OCT, um método quantitativo, fidedigno e com elevada reprodutibilidade (Krzystolik *et al.* 2007; Paunescu *et al.* 2004; Polito *et al.* 2005; Menke, Dabov, Knecht, *et al.* 2009; McDonald *et al.* 2007) tem permitido o diagnóstico precoce de EMD com envolvimento do centro da mácula, o EMD subclínico (N. M. Bressler *et al.* 2012; Pires, Santos, Nunes, Lobo, *et al.* 2013), como à frente se discutirá.

Quadro 1. Espessura da retina normal, OCT Stratus TD.

OCT STRATUS, TD NORMAIS	CPT $\pm$ DP REF.	CST $\pm$ DP REF.
Chan <i>et al.</i> , 2006 (Chan <i>et al.</i> 2006)	182 $\pm$ 23	212 $\pm$ 20
	136 - 228	172 - 252
Browning <i>et al.</i> , 2008 (Browning, Fraser & Clark 2008)	174 $\pm$ 28	208 $\pm$ 22
	118 - 230	164 - 252
Wolf-Schnurrbusch <i>et al.</i> , 2009 (Wolf-Schnurrbusch <i>et al.</i> 2009)		213 $\pm$ 19
		175 - 251
Grover <i>et al.</i> , 2010 (Grover <i>et al.</i> 2010)	166.9 $\pm$ 20.9	202.3 $\pm$ 19.6
	125 - 209	163 - 242
Kashani <i>et al.</i> , 2010 (Kashani <i>et al.</i> 2010)	156.9 $\pm$ 3.2	194.5 $\pm$ 2.7
	151 - 163	189 - 200
Pires <i>et al.</i> , 2013 (Pires, Santos, Nunes & Lobo 2013)	171.3 $\pm$ 20	201.1 $\pm$ 18.9
	130 - 210	160 - 240

Valores médios de espessura da retina e desvio padrão (DP), em  $\mu\text{m}$ , e valores referência (média  $\pm$  2 DP), em  $\mu\text{m}$ , obtidos em populações normais com o OCT Stratus, no ponto de interseção dos 6 *scans* radiários (CPT) e na área central com diâmetro de 1000  $\mu\text{m}$  (CST).

OCT – optical coherence tomography; TD – *time-domain*; CPT – *central point thickness*; DP – desvio padrão; CST – *central subfield thickness*; REF. – valores referência.

#### **4.6.3.4. Reprodutibilidade – Sistema *Time - Domain***

Para avaliar a reprodutibilidade do OCT, Massin *et al.* utilizaram o primeiro sistema de OCT comercializado e observaram boa reprodutibilidade, com coeficientes de variação de 0.6% a 3.3% nos indivíduos saudáveis (N = 10 olhos) e reprodutibilidade de 6% em diabéticos com EMCS (N = 10 olhos) (Massin *et al.* 2001). Polito *et al.* usaram o *fast macular thickness protocol* do OCT Stratus e encontraram um coeficiente de reprodutibilidade inferior a 10% em indivíduos saudáveis e 11% em indivíduos com EMCS (Polito *et al.* 2005). Também com o OCT Stratus, mas usando diferentes protocolos de aquisição, Paunescu *et al.* encontraram boa reprodutibilidade do sistema em indivíduos normais (Paunescu *et al.* 2004). Dez indivíduos normais foram analisados 6 vezes por dia (3 antes de dilatação e 3 após midríase), e as séries foram repetidas em 3 dias diferentes. As medições da espessura da camada de fibras nervosas, bem como, da espessura macular, foram reprodutíveis. Em indivíduos saudáveis, e após medições repetidas da espessura da retina com o OCT Stratus, Wolf-Schnurrbusch *et al.* observaram um coeficiente de variação de 3.33% (Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009).

#### **4.6.4. OCT no EMD**

##### **4.6.4.1. Diagnóstico clínico do EMD *versus* diagnóstico pelo OCT**

É reconhecido que a avaliação clínica do EMD é subjetiva e variável. O OCT permite quantificar a espessura da retina e realizar uma avaliação morfológica, e assim tornou-se nos últimos anos num método essencial para o diagnóstico e avaliação da resposta ao tratamento do EMD, na prática clínica e em ensaios clínicos. O OCT complementa de forma objetiva, reprodutível e sequencial a informação clínica e baseada nas fotografias a cores do fundo ocular (Hee *et al.* 1998; Hee, Puliafito, *et al.* 1995; Massin *et al.* 2010; Scott *et al.* 2007; Arevalo *et al.* 2009; Brown *et al.* 2013; Nepomuceno *et al.* 2013).

Para avaliar a forma como o método clínico se compara com a avaliação da espessura da retina pelo OCT vários estudos foram realizados.

Em 2004, Browning *et al.* compararam o diagnóstico clínico de EMCS, tal como definido pelo ETDRS (ETDRS 1985), determinado pela biomicroscopia com estereopsia na lâmpada de fenda e uma lente de +78 dioptrias, e o diagnóstico pelo OCT, em 143 olhos de 80 doentes (Browning *et al.* 2004). Nos indivíduos com EMCS os valores de espessura da retina na área macular eram superiores aos valores de uma população normal, usada como controlo. Os autores observaram discordâncias entre os 2 métodos, mais frequentemente a deteção de aumento da espessura da retina pelo OCT, não observado clinicamente (mais raramente o exame clínico detetou aumento não verificado no OCT). Reportaram uma concordância entre os 2 métodos na fóvea de 0.63 e concluíram que, na avaliação do EMD, a deteção clínica é menos sensível que o OCT (Browning *et al.* 2004). Mais tarde, em 2008, Browning *et al.*, num estudo retrospectivo em doentes diabéticos com vários níveis de RD (100 sem RD, 100 com RDNP ligeira/moderada, 35 com RDNP grave e RDP, 48 com RDP que regrediu), mas sem EMD no exame clínico, constataram que cerca de 15% destes olhos tinha EMD no OCT, quando comparado com uma população normal usada como controlo neste estudo (Browning, Fraser & Clark 2008). Observaram, também, que a probabilidade de aumento da espessura da retina era maior com o aumento da gravidade da RD subjacente.

Os achados de Browning *et al.* em 2004 estavam em consonância com as observações prévias de Hee *et al.* (Hee *et al.* 1998). Estes autores estudaram 237 olhos de indivíduos diabéticos, 182 com RD e 55 sem RD, e encontraram concordância perfeita entre os métodos clínico e o OCT para valores de espessura na fóvea (área central com 500  $\mu\text{m}$ ) normais ou extremos, mas discordância entre os métodos quando a espessura da fóvea estava entre 200 e 325  $\mu\text{m}$  (neste estudo a espessura média da fóvea foi considerada anormal quando  $> 216$ , o valor máximo medido na população normal usada como controlo). Concluíram que o OCT é mais sensível que o exame clínico para avaliar a presença de EMCS, e um método que permite identificar o desenvolvimento precoce de edema macular, em doentes com lesões iniciais de RDNP (Hee *et al.* 1998).

Brown *et al.* estudaram 172 olhos de 95 doentes diabéticos, com vários níveis de RD, incluindo ausência de lesões na fundoscopia. Os autores encontraram boa concordância ( $\kappa=0.697$ ) entre o método clínico e o OCT na deteção de ausência ou presença de edema da fóvea, quando a espessura da retina no OCT foi considerada normal ( $\text{OCT} \leq 200 \mu\text{m}$ ) ou moderada/gravemente aumentada ( $\text{OCT} > 300 \mu\text{m}$ ). Todavia, a concordância foi baixa ( $\kappa=0.378$ ) quando a espessura da fóvea no OCT estava ligeiramente aumentada (entre 201 e 300  $\mu\text{m}$ ) (Brown *et al.* 2004). Em conclusão, este estudo sugere que o exame clínico é relativamente insensível para a deteção de aumento ligeiro da espessura da fóvea, que é aparente no OCT. Os autores propuseram o termo de edema foveal subclínico para descrever olhos nos quais métodos objetivos mostram um aumento até 50% da espessura normal (201 e 300  $\mu\text{m}$ ), que não é consistentemente detetado clinicamente na lâmpada de fenda (Brown *et al.* 2004). Este importante estudo permitiu ao DRCR.net definir o limite superior de espessura da retina que marca a presença de EMD subclínico (299  $\mu\text{m}$  no OCT Stratus) (N. M. Bressler *et al.* 2012). Assim, de acordo com as observações de Brown *et al.*, 299  $\mu\text{m}$  no OCT Stratus corresponde ao limiar da deteção clínica.

Num estudo em que compararam os achados no OCT com achados clínicos e angiográficos, Ozdek *et al.* observaram, em 195 olhos de 110 diabéticos com vários níveis de RD, uma concordância de 77% entre os métodos clínico e o OCT no diagnóstico de EMD; observaram, também, edema macular cistoide com o OCT em 15.4% dos olhos, dos quais 40% e 63.3%, respetivamente, não foram aparentes, clínica ou angiograficamente (Ozdek *et al.* 2005).

A avaliação pelo OCT também parece ser mais sensível do que a classificação das fotografias a cores do fundo ocular para detetar aumento ligeiro de espessura da retina. Assim, Virgili *et al.* fizeram uma meta-análise da literatura e reviram um total de 15 estudos para avaliar a sensibilidade e especificidade do OCT no diagnóstico de EMD, em relação à avaliação clínica e baseada nas fotografias a cores do fundo ocular (Virgili *et al.* 2007). Concluíram uma sensibilidade de 0.79 e uma especificidade de 0.88,

sugerindo que o OCT tem um bom desempenho no diagnóstico do EMD, face ao diagnóstico clínico e fotográfico.

Outra vantagem do OCT sobre o exame clínico e a fotografia a cores do fundo ocular é a possibilidade de avaliação da interface vitreomacular (Ghazi *et al.* 2007). Esta interface é difícil de avaliar e detectar no exame clínico, mas pode ser visualizada no OCT como uma estrutura fina e hiperrefletiva na cavidade vítrea, a uma distância da superfície da retina, quando existe descolamento posterior do vítreo completo ou incompleto. Neste último caso, podem ser aparentes aderências ao tecido retiniano perifoveal ou peripapilar (Gaucher *et al.* 2005).

A capacidade para avaliar esta interface permitiu uma melhor compreensão de alguns casos de edema macular persistente, nos quais a tração vitreomacular desempenha um papel importante. Estes casos de EMD, com tração vítrea no OCT, são candidatos a tratamento cirúrgico, nomeadamente através de vitrectomia *via pars plana* e libertação de tração, e não tratamento laser ou com medicação intra-vítrea de anti-VEGF.

#### **4.6.4.2. Espessura da Retina**

A avaliação clínica do edema macular é baseada na fotografia a cores do fundo ocular é subjetiva e aparentemente insensível a pequenas alterações da espessura da retina. O uso complementar do OCT tem permitido uma avaliação objetiva e reprodutível.

O edema com envolvimento do centro, e que portanto se correlaciona com a AV, é frequentemente avaliado pelas medições do CPT ou CST. No entanto, o valor de CST é a referência clínica mais usada em ensaios clínicos que estudam o EMD com envolvimento do centro (Browning, Glassman, *et al.* 2008). Embora exista uma alta correlação entre os valores de CPT e CST (Browning *et al.* 2007; Davis *et al.* 2008), o valor de CST parece ser menos suscetível aos erros de medição do aparelho e mais reprodutível (Krzystolik *et al.* 2007; Chan & Duker 2005). Num estudo de

reprodutibilidade do OCT em doentes com EMD, Krzystolik *et al.* mostraram que a reprodutibilidade do CST era melhor que a do CPT (38  $\mu\text{m}$  versus 50  $\mu\text{m}$ ), e que a diferença absoluta média entre várias medições do CST era de apenas 7  $\mu\text{m}$  (2%) (Krzystolik *et al.* 2007).

Em geral, o OCT é um método fidedigno e reprodutível para medir a espessura da retina. A espessura da retina em olhos com EMD diminui em média 6% ao longo do dia (Danis *et al.* 2006), e a variabilidade entre testes das medições de OCT é inferior a 10% nos indivíduos diabéticos (Browning, Fraser & Propst 2008).

### **Fases iniciais da RD/EMD**

A introdução do OCT veio permitir o diagnóstico mais precoce do edema da retina em indivíduos diabéticos, antes da percepção de aumento da espessura macular no exame clínico, e que tem sido designado como EMD subclínico. O EMD subclínico é, pois, amplamente definido como um aumento da espessura da retina macular central documentado em exames objetivos, como o OCT, mas clinicamente não aparente. Embora reconhecido por vários autores (Hee, Puliafito, *et al.* 1995; Massin *et al.* 2002; Brown *et al.* 2004; Sng *et al.* 2012), a compreensão da história natural e quais as implicações prognósticas, e até terapêuticas, da sua deteção só mais recentemente foram abordadas na literatura e pelo nosso grupo de investigação.

Browning e Fraser estudaram retrospectivamente 153 olhos de 153 doentes diabéticos, com lesões de RD e EMD subclínico. Neste estudo, o EMD subclínico foi definido como edema macular reconhecido clinicamente mas de gravidade inferior ao limiar de EMCS, ou edema não clinicamente observado mas detetado pelo OCT, em qualquer das 9 áreas do mapa de espessura da retina do OCT. Dos 153 olhos, 48 progrediram para EMCS durante um período observacional de 14 meses (Browning & Fraser 2008). Neste estudo, os autores não encontraram fatores oculares, nomeadamente baseados no OCT, ou fatores sistémicos significativamente associados à progressão de EMD subclínico para EMCS. No entanto, a maior gravidade da RD associou-se a esta progressão, embora de forma não significativa.

Mais recentemente, o DRCR.net desenhou um estudo observacional e prospectivo para avaliar a progressão do EMD subclínico (N. M. Bressler *et al.* 2012).

Este grupo definiu o EMD subclínico pela ausência de edema envolvendo a fóvea, determinada pela observação na lâmpada de fenda, e um CPT no OCT Stratus  $\geq 225$   $\mu\text{m}$  e  $\leq 299$   $\mu\text{m}$  (N. M. Bressler *et al.* 2012). Nesta definição, o limite inferior de espessura da retina, acima do qual o EMD subclínico é considerado, 225  $\mu\text{m}$ , foi baseado num estudo prévio realizado pela mesma rede. Este estudo de 2008 avaliou a espessura da retina em indivíduos diabéticos, sem lesões de RD/RDNP ligeira, e quis estabelecer o nível de espessura da retina com o OCT Stratus que permite presumir, em olhos de indivíduos diabéticos, a presença ou ausência de edema da retina (Bressler *et al.* 2008). Observaram um valor médio  $\pm$  DP de CPT de  $166 \pm 23$   $\mu\text{m}$ , que variou entre 118  $\mu\text{m}$ , o valor mínimo, e 225  $\mu\text{m}$ , o valor máximo (valores referidos no quadro 2). Em geral, os valores médios de CPT e CST que obtiveram foram semelhantes aos valores de bases normativas calculadas em populações normais sem diabetes (Bressler *et al.* 2008). Nenhum doente neste grupo de diabéticos, sem RD/com RDNP ligeira, apresentou um valor de CPT superior a 225  $\mu\text{m}$ ; por outro lado, 225  $\mu\text{m}$  era um valor ligeiramente superior ao valor médio adicionado de 2 DP, pelo que foi adotado como o limiar inferior da definição de EMD subclínico proposta pelo DRCR.net (Bressler *et al.* 2008). O limiar superior da definição, ou seja, 299  $\mu\text{m}$ , corresponde ao que Brown *et al.* previamente consideraram o limiar da deteção clínica de espessamento da retina (Brown *et al.* 2004).

O objetivo primário do estudo do DRCR.net de olhos com EMD subclínico foi avaliar a frequência com que se observava um aumento de espessura de 50  $\mu\text{m}$  no OCT, ou evolução para EMCS, requerendo tratamento, durante um período de 2 anos. Depois de rastreamento 891 olhos de 582 indivíduos com DM, tipo 1 ou tipo 2, identificaram 43 olhos elegíveis para o estudo, de acordo com os critérios de inclusão que definiram: AV  $\geq 74$  letras na escala ETDRS, espessura macular central normal na biomicroscopia com estereopsia, espessura no CPT no OCT Stratus entre 225 e 299  $\mu\text{m}$  e lesões de RDNP moderada (nível ETDRS  $\geq 35$ ) na avaliação clínica. Este estudo



encontrou uma prevalência de EMD subclínico de 4,8%, tendo concluído que é raro, mas, quando presente, aproximadamente um quarto a metade dos olhos progredirão para EMCS que requer tratamento em 2 anos.

O nosso grupo de investigação estudou prospetivamente 410 olhos de 410 doentes com DM tipo 2 e lesões de RDNP ligeiras, durante 2 anos (research project PTDC/SAU-OSM/72635/2006 (trial registry NCT00763802, [ClínicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov))). Este estudo observacional foi desenhado para seguimento dos doentes diabéticos até ao desenvolvimento de EMCS, o objetivo primário, ou durante um período de 2 anos.

Os critérios de inclusão no estudo foram: DM tipo 2; idade entre 40 e 80 anos; uma AV  $\geq 20/25$  ( $\geq 79$  letras), na escala ETDRS; ausência de espessamento da retina na área macular, na observação clínica na lâmpada de fenda; presença de lesões de RDNP ligeira, níveis ETDRS 20/35, determinadas na observação clínica e confirmadas pelo centro de leitura nas fotografias a cores do fundo ocular; refração com equivalente esférico inferior a 5 dioptrias; apenas um olho por doente. Foram excluídos doentes com história de patologia renal, hepática ou pancreática; catarata ou outra opacificação dos meios que interfira com a observação do fundo ocular ou com a obtenção de *scans* de OCT de boa qualidade; glaucoma; sinerese do vítreo ou descolamento posterior do vítreo; outra doença vascular da retina; cirurgia intraocular recente; tratamento laser prévio ou qualquer outra modalidade de tratamento do edema macular.

O EMCS foi identificado na avaliação clínica na lâmpada de fenda de acordo com os critérios do ETDRS, e que consistem na presença de aumento da espessura da retina nos 500  $\mu\text{m}$  centrais da mácula; ou presença de exsudatos duros nos 500  $\mu\text{m}$  centrais da mácula, quando associados a espessamento da retina adjacente; ou uma área ou áreas de espessamento da retina com pelo menos 1 disco de área, em que qualquer parte está localizada a pelo menos 1 disco de diâmetro do centro da mácula (ETDRS 1985).

Durante o período de seguimento, os doentes foram avaliados em 3 ocasiões, aos 0, 6 e 24 meses; quando detetado EMCS antes dos 24 meses, a avaliação final foi a efetuada imediatamente antes do tratamento do edema. As avaliações compreenderam sempre a realização de exame oftalmológico; fotografia a cores do fundo ocular com estereopsia, dos 7 campos *standard* ETDRS, para determinar, na visita inicial, a elegibilidade, e na visita final, a progressão do nível de RD, com base na escala de classificação de gravidade da RD ETDRS, uma modificação do esquema de Arlie House (ETDRS 1991e); medição da espessura da retina na área macular com o OCT Stratus (Carl Zeiss Meditec, Inc., Dublin, CA), versão 4, adquirida com o protocolo *fast macular thickness*. Adicionalmente, na visita inicial, foram registados dados demográficos, duração da diabetes e tratamento atual, medicação concomitante, e avaliados o peso, a altura e a pressão arterial, diastólica e sistólica; e foram realizadas análises sanguíneas para determinação de níveis séricos de HbA1c, colesterol total, colesterol de lipoproteínas de alta e baixa densidade, e triglicéridos. O estudo decorreu entre Setembro de 2007 e Novembro de 2011.

Foram incluídos 410 olhos de 410 indivíduos com DM tipo 2 (259 homens e 151 mulheres) e lesões de RDNP ligeira na fundoscopia, com uma média de idade de  $61.2 \pm 8.3$  anos (variação 40 - 78), duração média de DM de  $10.0 \pm 5$  anos (variação 1 - 21) e HbA1c média de  $7.9 \pm 1.5\%$  (variação 5.0 - 13.0). No exame oftalmológico estes doentes apresentaram, na visita inicial, uma AV corrigida média de  $85.6 \pm 4.1$  letras (aproximadamente 20/25 na escala de Snellen) e na fundoscopia lesões de RDNP ligeiras, sem edema macular aparente. No OCT não se observaram alterações do normal perfil da retina, nomeadamente na fóvea, e/ou da morfologia intrarretiniana.

Trezentos e setenta e seis doentes realizaram a avaliação intermédia, aos 6 meses, e 348 completaram o seguimento do estudo, ou seja, 17 desenvolveram EMCS com indicação para tratamento, no período entre os meses 6 e 24, e 331 realizaram a avaliação dos 24 meses. Nesta avaliação aos 24 meses foi adicionalmente detetado EMCS em 9 olhos. Ao todo, durante o seguimento do estudo, 26 olhos desenvolveram

EMCS. Sessenta e dois doentes abandonaram o estudo, por várias razões (morte, desistência). A figura 8 ilustra o fluxograma do estudo observacional.

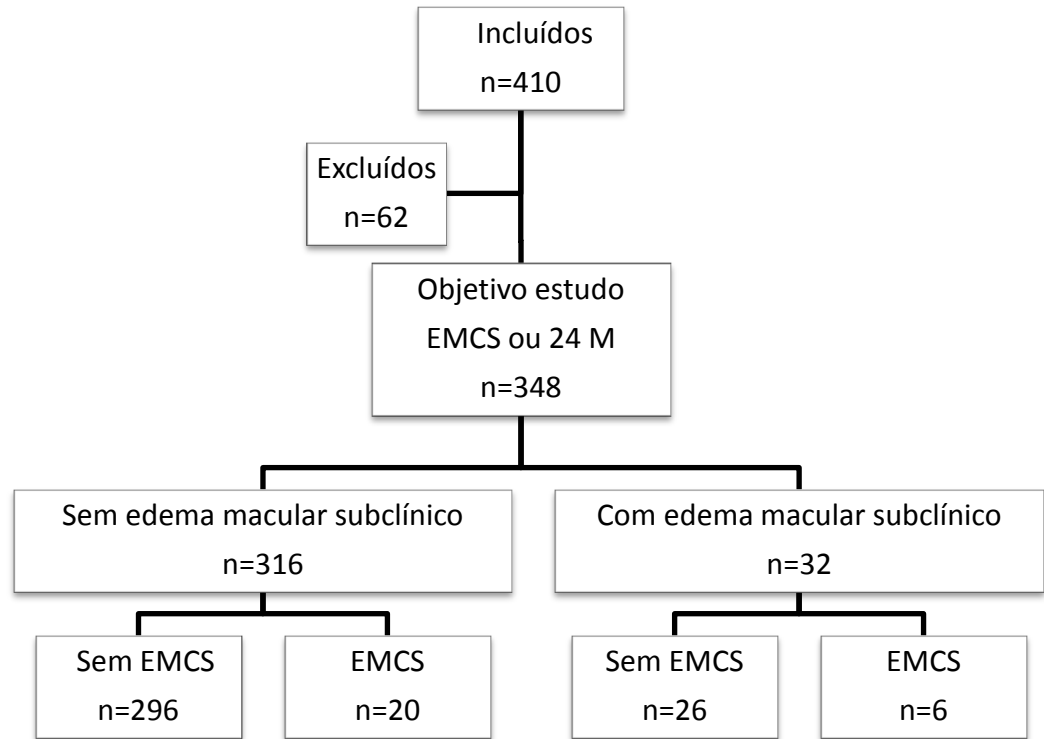


Figura 8. Fluxograma do estudo observacional.

Globalmente, entre a avaliação inicial e a final (N = 348) constatou-se, no grupo de estudo, diminuição de AV (de  $85.8 \pm 4.1$  para  $84.5 \pm 6.0$  letras,  $p=0.090$ ) e aumento do valor de CPT (de  $187.3 \pm 28.4 \mu\text{m}$  para  $190.8 \pm 48.4 \mu\text{m}$ ,  $p=0.158$ ), não significativos. Adicionalmente, durante o seguimento do estudo, observou-se, clinicamente e nas fotografias a cores do fundo ocular, progressão do nível de gravidade de RD ETDRS em 15 olhos, do nível 35 (RDNP ligeira) para o nível 43 (RDNP moderada). Neste grupo de olhos não se observou diferença significativa entre a AV inicial e a final ( $p=0.427$ ), ou seja, não se observou perda significativa de AV. Por outro lado, também não se observou diferença significativa entre a AV inicial e final em olhos com agravamento do nível de RD *versus* olhos sem agravamento ( $p=0.490$ ), sugerindo que o agravamento da RD subjacente não contribuiu para alteração de AV.

Procurámos investigar a história natural do EMD subclínico, a taxa de progressão para EMCS, e a influência de características oculares e sistémicas associadas a esta progressão, durante os 2 anos de duração deste estudo observacional. Assim, entre os participantes elegíveis para o estudo prospetivo, fomos identificar quais os que, na visita inicial, apresentavam EMD subclínico, de acordo com a definição que adotámos, a definição proposta pelo DRCR.net, e que consiste em ausência de edema na fóvea, na avaliação clínica, e um valor de CPT no OCT Stratus entre 225 e 299  $\mu\text{m}$  (N. M. Bressler *et al.* 2012). Figura 9

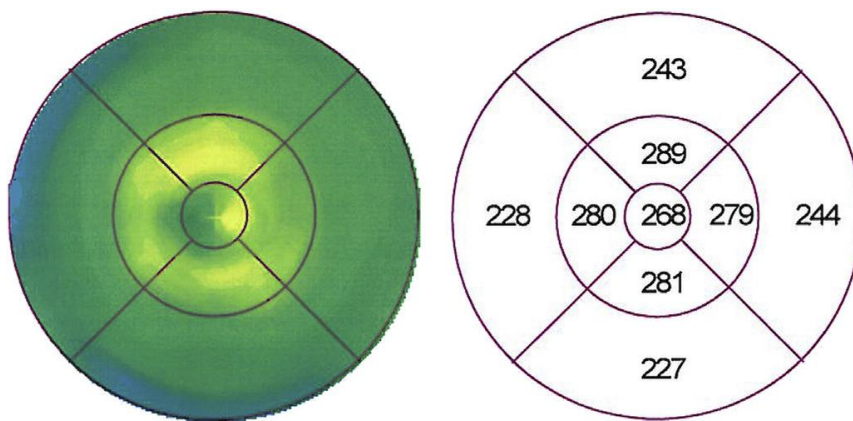


Figura 9. OCT Stratus TD de um doente com edema macular diabético subclínico. Representação a cores, à esquerda, e representação numérica, à direita.

Na visita inicial foi detetado EMD subclínico em 38 olhos, ou seja, uma prevalência de 9,3% no grupo de 410 olhos/doentes incluídos (foi incluído apenas um olho por doente). Dos 38 olhos inicialmente identificados, 32 doentes/olhos completaram o seguimento do estudo, ou seja, desenvolveram EMCS (antes dos 24 meses) ou realizaram a avaliação final, aos 24 meses. Neste grupo de 32 olhos/doentes, com EMD subclínico na visita inicial, a progressão para EMCS foi detetada clinicamente em 6 olhos; em 3, entre os meses 6 e 24, e noutros 3, aos 24 meses.

A análise de regressão mostrou que doentes com EMD subclínico apresentaram um risco de progressão para EMCS 3.686 vezes maior que doentes sem EMD subclínico na visita inicial (95% confidence interval 1.261 - 10.771;  $p=0.017$ ). Adicionalmente, por cada 1% de aumento no valor de HbA1c, o risco de desenvolverem EMCS aumentava

por um fator de 1.567 (95% confidence interval 1.120 - 2.191;  $p=0.009$ ). Em olhos com EMD subclínico não se encontraram outras associações, oculares ou sistêmicas, relacionadas com a progressão para EMCS.

Este estudo confirmou as observações dos estudos prévios de Browning *et al.* e do DRCR.net sobre a história natural do EMD subclínico (Browning & Fraser 2008; N. M. Bressler *et al.* 2012). No estudo do DRCR.net uma proporção estimada de 38% de olhos com EMD subclínico desenvolveram EMCS num período de 2 anos após a sua identificação; no estudo de Browning *et al.*, usando uma definição de EMD subclínico ligeiramente diferente, os autores encontraram uma taxa de conversão de 31.4% durante um período de seguimento de 14 meses. Estes valores são mais elevados do que a taxa de 18.7% que encontramos no nosso estudo observacional de EMD subclínico. De qualquer maneira, estudos independentes validaram o EMD subclínico em doentes diabéticos como um biomarcador relacionado com a doença, com valor prognóstico para o desenvolvimento de EMCS.

É ainda de realçar que, na visita inicial, a comparação da AV entre olhos com EMD subclínico ( $N = 32, 84.5 \pm 3.9$  letras) *versus* ausência de EMD subclínico ( $N = 316, 85.9 \pm 4.1$  letras) não mostrou diferença significativa ( $p=0.06$ ); porém, na visita final, a diferença entre estes 2 grupos tornou-se significativa ( $N = 32, 82.3 \pm 5.5$  letras *versus*  $N = 316, 84.7 \pm 6.1$  letras,  $p=0.012$ ), traduzindo uma perda de AV durante o período de seguimento do estudo, mais acentuada nos olhos com EMD subclínico. Esta observação sugere que a presença de EMD subclínico se associa a futura perda de AV.

No que diz respeito à progressão do nível de gravidade da RD subjacente, esta ocorreu em 15 olhos, 2 com EMD subclínico (que não desenvolveram EMCS). Neste grupo de olhos não se observou perda significativa de AV, sendo a AV final comparável com a AV final de olhos que não progrediram na escala ETDRS. Portanto, a perda de AV observada neste estudo está associada ao edema da retina, identificado pelo aumento de espessura da fóvea. Esta observação está em consonância com os achados de estudos prévios com a ruboxiestaurina, um inibidor da PKC administrado oralmente

em doentes com EMD, que mostraram que a causa mais provável para a perda moderada de AV nos olhos de estudo foi a presença de edema da retina com envolvimento do centro da mácula (Sheetz *et al.* 2013; Aiello, Vignati, *et al.* 2011). Nas fases iniciais da RD, o aumento da espessura da retina está associado à rutura da BHR interna, uma alteração precoce (Lobo *et al.* 2004; Cunha-Vaz *et al.* 2011). A resultante acumulação de fluido nas camadas da retina na fóvea pode levar a perda de AV por disfunção celular intrarretiniana e/ou pela promoção de uma resposta inflamatória reparadora (Cunha-Vaz *et al.* 2011). Por outro lado, alguns autores têm reportado evidências de morte das células ganglionares e degeneração axonal como eventos precoces no decurso da RD (van Dijk *et al.* 2012). Aparentemente, nas fases iniciais da RD, ambos os processos, degeneração neuronal e rutura da BHR interna, coexistem, em graus variáveis, em doentes diferentes.

O grupo de doentes sem EMD subclínico na visita inicial era constituído por 372 olhos/doentes. Deste grupo, 341 realizaram a avaliação aos 6 meses, sem EMCS aparente. Trezentos e dezasseis completaram o seguimento do estudo. Vinte olhos desenvolveram EMCS, detetado entre os meses 6 e 24 do seguimento (N = 14) ou na avaliação aos 2 anos (N = 6). Duzentos e noventa e seis realizaram a avaliação final (24 meses) sem progressão clínica para EMCS (AV inicial:  $85.9 \pm 4$  letras e AV final:  $84.8 \pm 5.5$  letras; CPT inicial:  $181 \pm 22.9 \mu\text{m}$  e CPT final:  $182.8 \pm 30 \mu\text{m}$ ). Nos olhos que desenvolveram EMCS (N = 20) constatou-se, durante o período observacional do estudo, uma diminuição da AV e um aumento de CPT, embora não significativos (AV inicial:  $86 \pm 4.5$  letras *versus* AV final:  $82.8 \pm 11.1$  letras,  $p=0.08$ ; CPT inicial:  $188.2 \pm 19.4 \mu\text{m}$  *versus* CPT final:  $227.6 \pm 135.8 \mu\text{m}$ ,  $p=0.09$ ).

### **Em conclusão**

Os resultados deste estudo mostraram que a presença de EMD subclínico, identificado pelo OCT em doentes diabéticos com lesões iniciais de RD, e o controlo metabólico, avaliado pelo nível da HbA1c, são preditores da progressão das lesões de RD para EMCS. O EMD subclínico parece, pois, ser um bom candidato a biomarcador

orgão-específico da progressão de RD para EMCS, validado por outros estudos, independentes (Browning, Fraser & Propst 2008; N. M. Bressler *et al.* 2012).

Este estudo salienta, também, a importância do controlo metabólico na diabetes, para evitar a progressão da doença retiniana. Efetivamente, o nível de HbA1c permanece como o único biomarcador prognóstico sistémico de progressão da RD validado (DCCT 1995a; Antonetti *et al.* 2012; Cunha-Vaz *et al.* 2014).

O EMD subclínico, embora raro, quando detetado, é uma indicação segura para intensificar o controlo metabólico e a vigilância oftalmológica. Idealmente, o controlo metabólico e da pressão arterial deverão ser realizados cada 3 meses, pelo menos, tentando atingir e manter um valor de HbA1c < 7.1%, uma pressão arterial sistólica < 140 mmHg e uma pressão arterial diastólica < 85 mmHg, em estreita colaboração com o médico assistente (endocrinologista/internista/medicina geral). Os exames oftalmológicos deverão tornar-se semestrais, pelo menos, para detetar precocemente o limiar de tratamento e qual a terapêutica mais adequada de acordo com a morfologia do OCT, e evitar perda visual futura associada a lesão estrutural prolongada. O objetivo do tratamento pode ser parar, atrasar ou limitar a progressão do aumento da espessura da retina para EMCS.

A determinação de valores médios da espessura macular nas fases iniciais da RD, e comparação com grupos controlo normais, tem sido objeto de várias publicações, e é um tema que também quisemos estudar. Na literatura encontram-se relatos com diferentes conclusões, por vezes até aparentemente contraditórias.

Assim, na DM tipo 2, uma diminuição do valor médio de CST foi reportada por Oshitari *et al.*, em doentes sem lesões de RD, e por Asefzadeh *et al.*, em doentes sem lesões de RD ou com RDNP ligeira, achado que os autores atribuíram ao processo neurodegenerativo que ocorre na retina diabética, precocemente, precedendo as alterações microvasculares (Oshitari *et al.* 2009; Asefzadeh *et al.* 2007). As

subsequentes observações de Oshitari *et al.*, um aumento da espessura macular central na fase de RDNP ligeira, deram suporte à sua tese de que a disfunção neuronal precede a disfunção microvascular (Oshitari *et al.* 2009). Acrescente-se, no entanto que, no seu estudo, o grupo de diabéticos sem lesões de RD apresentava, em média, curta duração da diabetes (Oshitari *et al.* 2009).

Outros estudos, que incluíram grupos de indivíduos com ambos os tipos de diabetes, nas fases iniciais da doença retiniana, não encontraram diferenças na espessura média da retina entre diabéticos e grupo controlo (normais), quer em doentes sem lesões de RD (Bressler *et al.* 2008; Kashani *et al.* 2010; Sng *et al.* 2012; Chalam *et al.* 2012), quer em doentes com lesões de RDNP ligeira (Bressler *et al.* 2008; Sng *et al.* 2012; Chalam *et al.* 2012). Destes, o estudo realizado pelo DRCR.net em 2008, em particular, observou nos doentes diabéticos incluídos valores de espessura da retina no ponto central da fóvea (CPT) que variaram entre um mínimo de 118  $\mu\text{m}$  e um valor máximo de 225  $\mu\text{m}$ . Este valor de espessura, 225  $\mu\text{m}$ , foi posteriormente usado na definição de EMD subclínico, constituindo o seu limiar inferior (o limiar superior consiste em 299  $\mu\text{m}$ ), definição que adotámos no nosso estudo observacional de EMD subclínico, por forma a poder comparar os nossos resultados com os resultados previamente reportados pelo DRCR.net.

Por fim, valores aumentados da espessura macular central foram documentados por alguns autores em diabéticos com RDNP ligeira (Hee *et al.* 1998; Sánchez-Tocino *et al.* 2002; Lattanzio *et al.* 2002) ou sem RD (Sugimoto *et al.* 2005).

Relativamente à influência da idade na espessura da retina, alguns estudos não encontraram relação entre a espessura e a idade, em indivíduos diabéticos (Hee *et al.* 1998; Massin *et al.* 2002; Sánchez-Tocino *et al.* 2002). Contrariamente, o género parece influenciar a espessura da retina, tendo sido reportado, por alguns autores, valores de CST maiores nos homens diabéticos do que nas mulheres (Oshitari *et al.* 2009; Bressler *et al.* 2008; Kashani *et al.* 2010; Sng *et al.* 2012; Chalam *et al.* 2012).



Para avaliar o efeito da idade, sexo, duração da diabetes, controlo metabólico, avaliado pelo valor de HbA1c, pressão arterial e lípidos séricos nas medições da espessura da retina em indivíduos diabéticos, analisámos o grupo de participantes incluído no nosso estudo prospetivo, na visita inicial, constituído por 410 indivíduos, como acima descrito neste texto, e comparámos os resultados destes com os de uma população normal.

A base normativa criada no nosso centro, como já referido, era composta por 28 voluntários normais, 11 homens e 17 mulheres, com uma média de idade de  $53.4 \pm 8.7$  anos (variação 40 - 77 anos). No exame oftalmológico apresentavam uma AV de 20/20, refração com equivalente esférico inferior a 3 dioptrias, sem alterações maculares ou no disco ótico na fundoscopia. Para obter medições da espessura da retina na mácula, foi realizado o OCT Stratus, versão 4, com a mesma metodologia empregue no estudo dos doentes diabéticos. Obtiveram-se valores de CPT e CST de  $171.3 \pm 20$  e  $201.4 \pm 21.8$   $\mu\text{m}$ , respetivamente, não se tendo observado diferença entre o sexo masculino e feminino (Pires, Santos, Nunes & Lobo 2013). A comparação desta base normativa com a base normativa incorporada no sistema OCT Stratus (Carl Zeiss Meditec, Inc., Dublin, California, USA) não revelou diferenças significativas entre as duas, pelo que, face ao pequeno número de indivíduos incluídos na nossa base, optámos por usar para comparação com os doentes diabéticos a base normativa incorporada no sistema Zeiss. Nesta base de dados, obtida em 350 indivíduos saudáveis, com idades compreendidas entre os 20 e 80 anos, os valores referência de CPT e CST estão compreendidos, respetivamente, entre 135 a 210  $\mu\text{m}$ , e 160 a 240  $\mu\text{m}$  (Pires, Santos, Nunes & Lobo 2013).

No grupo de indivíduos com diabetes tipo 2 e lesões de RDNP ligeira (N = 410), obtivemos valores médios de espessura de CPT e CST ( $\pm$  DP), respetivamente, de  $186.6 \pm 28.4$   $\mu\text{m}$  e  $215.2 \pm 25$   $\mu\text{m}$ , significativamente aumentados em relação aos valores da base normativa (referência) nas mesmas localizações ( $p < 0.001$ ). Os valores de CST foram idênticos aos valores reportados por Oshitari *et al.* numa população idêntica, com o OCT Stratus (Oshitari *et al.* 2009). Nos homens, os valores médios de CPT e CST

foram significativamente superiores aos das mulheres (CPT:  $190 \pm 26.6 \mu\text{m}$  *versus*  $180.8 \pm 30.4 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ ; CST:  $219.2 \pm 23.2 \mu\text{m}$  *versus*  $208.4 \pm 26.6 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ , respetivamente), de acordo com as observações de alguns estudos prévios (Oshitari *et al.* 2009; Bressler *et al.* 2008; Kashani *et al.* 2010; Sng *et al.* 2012; Chalam *et al.* 2012). No entanto, outros estudos, que incluíram indivíduos com ambos os tipos de diabetes e lesões de RDNP ligeira, não encontraram diferenças na espessura da retina em relação a um grupo controlo (Bressler *et al.* 2008; Sng *et al.* 2012; Chalam *et al.* 2012).

Observou-se uma correlação forte entre os valores de CPT e CST ( $r = 0.934$ ,  $p < 0.001$ ); não se observou correlação entre a AV e a espessura da retina, quer no ponto central da fóvea (CPT) ( $r = 0.015$ ,  $p = 0.672$ ), quer no campo macular central (CST) ( $r = 0.029$ ,  $p = 0.408$ ). A análise de regressão mostrou que o sexo foi o único parâmetro associado com a espessura macular central; depois de ajustada ao sexo, nenhum fator sistémico se associou com a espessura da retina (Pires, Santos, Nunes & Lobo 2013). Similarmente, Asefzadeh *et al.* e Sng *et al.* também não encontraram uma associação entre as medições da espessura macular e parâmetros sistémicos (Asefzadeh *et al.* 2008; Sng *et al.* 2012).

Quando comparámos os valores de CST obtidos nos 410 olhos de indivíduos diabéticos, individualmente, com os valores referência normais de CST usados neste estudo,  $160 - 240 \mu\text{m}$ , obtidos com o OCT Stratus, constatou-se que os valores de CST estavam diminuídos em 2.9% (12 olhos), normais em 79.5% (326 olhos), e definitivamente aumentados em 17.6% (72 olhos). O aumento da espessura da retina nas fases iniciais da RD tem sido atribuído à rutura da BHR e resultante acumulação de fluido na retina (Cunha-Vaz *et al.* 2011). Por outro lado, nas fases iniciais, também tem sido demonstrada a morte de células ganglionares da retina e degeneração neurorretiniana, pela diminuição da espessura da camada de fibras nervosas e camada de células ganglionares, na DM tipo 1 e tipo 2 (Biallostowski *et al.* 2007; van Dijk *et al.* 2010; van Dijk *et al.* 2009; van Dijk *et al.* 2012; Cabrera DeBuc & Somfai 2010; Vujosevic & Midena 2013). Portanto, nas fases iniciais da RD, a degeneração neuronal e a rutura da BHR podem ocorrer em graus variáveis, em indivíduos diferentes. A

degeneração neuronal, e consequente diminuição da espessura da retina, pode efetivamente ser mascarada pela acumulação de fluido associada à rutura da BHR, resultando na aquisição de diferentes valores de espessura da retina em indivíduos diferentes, nas fases iniciais da RD (Pires, Santos, Nunes & Lobo 2013).

No quadro 2 encontram-se valores médios de espessura da retina macular central obtidos em grupos de indivíduos diabéticos, sem lesões de RD ou com lesões de RDNP ligeira, com o OCT Stratus, por diferentes autores, incluindo o nosso grupo de investigação. Mostra-se o valor médio da espessura da retina e respetivo DP, calculados no ponto de interseção dos 6 *scans* radiários (CPT) e na área macular central com diâmetro de 1000  $\mu\text{m}$  (CST).

Quadro 2. Espessura da retina nas fases iniciais da RD com o OCT Stratus TD.

OCT STRATUS, TD Fases iniciais RD	Nível de RD	CPT $\pm$ DP	CST $\pm$ DP
Kashani <i>et al.</i> , 2010 (Kashani <i>et al.</i> 2010)	Sem RD	157.8 $\pm$ 3.2	191.6 $\pm$ 2.7
DRCR.net, 2008 (Bressler <i>et al.</i> 2008)	Sem RD/ RDNP ligeira	166 $\pm$ 23 Min. - 118 Máx. - 225*	201 $\pm$ 22
Chalam <i>et al.</i> , 2012 (Chalam <i>et al.</i> 2012)	Sem RD/ RDNP ligeira	167	199 $\pm$ 24
Pires <i>et al.</i> , 2013 (Pires, Santos, Nunes & Lobo 2013)	RDNP ligeira	186.6 $\pm$ 28.4 H: 190 $\pm$ 26.6** M: 180.8 $\pm$ 30.4**	215.2 $\pm$ 25 H: 219.2 $\pm$ 23.2** M: 208.4 $\pm$ 26.6**

Valores médios de espessura da retina e desvio padrão (DP), em  $\mu\text{m}$ , obtidos em indivíduos diabéticos, sem RD/com RDNP ligeira, com o OCT Stratus, no ponto de interseção dos 6 *scans* radiários (CPT) e na área macular central com diâmetro de 1000  $\mu\text{m}$  (CST).

\* - o limiar inferior da definição de edema macular diabético subclínico proposta pelo DRCR.net (225  $\mu\text{m}$ ) foi baseada neste valor de CPT.

\*\* - diferença estatisticamente significativa entre homens e mulheres.

OCT – optical coherence tomography; TD – *time-domain*; RD – retinopatia diabética, CPT – *central point thickness*; DP – desvio padrão; CST – *central subfield thickness*; RDNP – retinopatia diabética não proliferativa; Min. – valor mínimo; Máx. – valor máximo; H – homens; M – mulheres.

## **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal, sob a identificação: PTDC/SAL-OSM/72635/2006 (trial registry NCT00763802, ClinicalTrials.gov).

## **EMD**

Em doentes diabéticos com EMCS, os mapas de espessura da retina obtidos com o OCT, quando comparados com mapas normais, mostram mais frequentemente um aumento da espessura na fóvea (Brown *et al.* 2013; Kakinoki *et al.* 2012), mas também, alteração dos valores nos anéis interno ou externo do mapa (ou nos subcampos em que são divididos), em múltiplas combinações (Browning & Fraser 2005; Tangelder *et al.* 2008; Forooghian *et al.* 2008; Kakinoki *et al.* 2012).

No EMD o aumento da espessura da retina acompanha e varia com os vários padrões morfológicos que se podem observar no OCT, como à frente se discutirá (Ozdek *et al.* 2005; Kim *et al.* 2006).

O OCT é também um método muito importante, e crescentemente usado na prática clínica e investigação, para avaliar a eficácia dos tratamentos do EMD, pela quantificação longitudinal da espessura da retina após a fotocoagulação com laser, injeção intravítrea de corticosteróides ou agentes anti-VEGF ou após vitrectomia (Flaxel *et al.* 2010; Haller *et al.* 2010; Nicholson & Schachat 2010; Ozdemir *et al.* 2005; Nguyen *et al.* 2012; Brown *et al.* 2013).

Uma alteração da espessura medida superior a 10% do valor determinado inicialmente tem sido considerada significativa e não uma variabilidade do método (Massin *et al.* 2001; Polito *et al.* 2005). A alteração da espessura deverá ser contextualizada com a AV e com as alterações estruturais induzidas.

#### 4.6.4.3. Sistema de OCT *Spectral - Domain*

O OCT de domínio espectral, ou *Spectral-domain* (SD), foi desenvolvido mais recentemente como a geração de OCT alternativa ao OCT TD (Wojtkowski *et al.* 2003). O OCT SD utiliza um espectrofotómetro e a transformação matemática de Fourier para gerar imagens de forma mais rápida, com melhor resolução axial e melhor registo dos *scans* longitudinais, permitindo uma visualização detalhada das camadas da retina, em relação aos *scans* obtidos com os sistemas TD prévios.

Neste sistema, o espelho referência não se move; é usada luz no espectro do infravermelho, em vez de um comprimento de onda em particular, o que permitiu melhorar a resolução. Um espectrómetro deteta os ecos de luz de todos os tempos de atraso simultaneamente, e a informação espectral é depois analisada pela análise de Fourier. Por esta razão são igualmente denominados OCT *Fourier-Domain*. O tempo necessário para aquisição de imagem é significativamente menor, até cerca de 100 vezes mais rápidos que os sistemas TD (Wojtkowski *et al.* 2003; Wojtkowski *et al.* 2005; Wojtkowski *et al.* 2004), permitindo a obtenção de mais de 20 000 imagens por segundo, o que melhora dramaticamente a resolução para aproximadamente 4 - 7  $\mu\text{m}$  (mais *A-scans* para cada *B-scan*), com melhor reprodutibilidade que os sistemas TD (Sull *et al.* 2010; Baskin 2010). O aumento substancial da velocidade de aquisição de *scans* permite obter dados tridimensionais (Kakinoki *et al.* 2009; Wojtkowski *et al.* 2005).

Pelo menos 7 sistemas de OCT SD foram lançados desde 2006.

O OCT SD é superior ao OCT TD em velocidade e resolução axial, teoricamente e clinicamente (Choma *et al.* 2003; Sull *et al.* 2010). Dada a sua superioridade técnica, e a diminuição de produção dos sistemas TD, é provável que os sistemas SD tomem o lugar do OCT TD (Liu *et al.* 2014).

Adicionalmente, alguns aparelhos de OCT SD podem ser combinados com outras modalidades imagiológicas, como a AF e a angiografia com verde de indocianina, com

sistemas confocais, o que permite a sobreposição das imagens e a identificação precisa da localização das alterações e avaliar a sua evolução temporal. Ou seja, é possível uma avaliação multimodal da patologia retiniana, com elevada reprodutibilidade.

Dada a maior resolução, espera-se que este sistema permita encontrar marcadores tomográficos que se associam à alteração da AV, úteis para prever a resposta ao tratamento do EMD.

### **Análise Qualitativa**

Como já referido para os sistemas TD, o perfil de refletividade das camadas da retina é representado nos *scans* do OCT numa escala cromática, de cinzentos ou colorida, de acordo com um código de “falsas” cores. Na escala monocromática, a luz mais intensamente refletida surge clara; na escala colorida, o vermelho/branco representam alta refletividade, o azul/preto baixa refletividade. No entanto, com os sistemas SD a imagem é mais frequentemente apresentada numa escala de cinzas (monocromática), e não de cor (como, por exemplo, no OCT Stratus TD), fator que pode aumentar a perceção de alterações mais subtis da refletividade do tecido, como apontado por alguns autores (Brar *et al.* 2009).

A melhor resolução axial e melhor registo dos *scans* longitudinais permite uma visualização mais detalhada do vítreo, das camadas que compõem a retina neurosensorial e o complexo fotorreceptores-EPR, e das lesões intra ou subretinianas que possam surgir no contexto de patologia, em relação aos *scans* obtidos com os sistemas TD. Figura 10 e 11

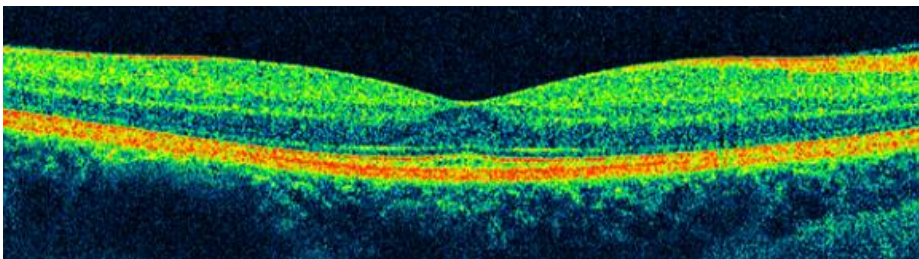


Figura 10. OCT SD. Imagem em secção da retina na área macular central, num indivíduo normal. Scan obtido com o OCT Cirrus.

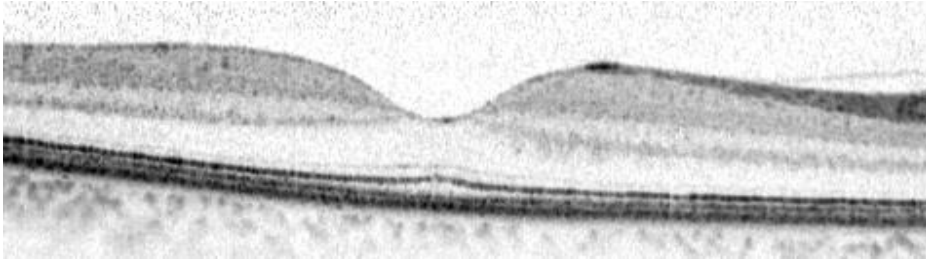


Figura 11. OCT SD. Imagem em secção da retina na área macular central, num indivíduo normal. Scan obtido com o OCT Spectralis.

Efetivamente, na retina externa, ou seja complexo fotorreceptores-EPR, a imagiologia das camadas que a compõem é feita diferentemente pelos sistemas TD e SD (Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009; Kakinoki *et al.* 2009; Ibrahim *et al.* 2012; Giammaria *et al.* 2011). Nesta área, o OCT Stratus TD deteta 2 linhas hiperrefletivas, que parecem corresponder à junção entre os segmentos internos e os segmentos externos dos fotorreceptores e ao EPR, respetivamente. Os sistemas de OCT SD detetam 4 linhas hiperrefletivas nesta área, com correlação anatómica (ainda) controversa. De qualquer maneira, a mais interna, com refletividade alta-média, poderá corresponder à membrana limitante externa; a segunda poderá corresponder à junção entre os segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores, a terceira corresponderá aos *tips* dos segmentos externos dos fotorreceptores (linha COST – *cone outer segments tips*) e a quarta corresponde ao EPR e membrana de Bruch (Pircher *et al.* 2006; Ooto *et al.* 2010; Srinivasan *et al.* 2006; Srinivasan *et al.* 2008). Em 2011, Spaide e Curcio questionaram a correlação anatómica atribuída à segunda e terceira linhas hiperrefletivas, considerando que poderão corresponder, a segunda, à porção elipsoide dos segmentos internos dos fotorreceptores, e a terceira, ao envolvimento dos segmentos externos dos cones por processos apicais do EPR, conhecido anatomicamente como cilindro de contacto (Spaide & Curcio 2011). Esta diferença explica a diferente segmentação pelos sistemas TD e SD, quando medem a espessura da retina, adquirindo valores diferentes, como à frente se verá.

A análise da morfologia da retina no EMD com o OCT será discutida mais à frente nesta tese.

### Análise Quantitativa

O cálculo da espessura da retina depende da segmentação, o algoritmo de processamento da imagem que identifica estruturas hiperrefletivas nos *scans* e delimita os bordos interno e externo da retina, entre os quais mede a espessura da retina. Todos os sistemas de OCT, TD e SD, parecem identificar a interface vitreoretiniana como o bordo interno da retina (Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009). A segmentação do bordo externo da retina, ao nível da 2ª, 3ª ou 4ª linha hiperrefletiva, é que difere significativamente entre os instrumentos TD e SD e entre os vários sistemas SD (Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009). O OCT Stratus mede a espessura da retina até à linha de junção dos segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores, enquanto os sistemas SD medem até ao EPR (Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009). Cada sistema SD tem um algoritmo diferente (Ibrahim *et al.* 2012). Por exemplo, o OCT Cirrus SD mede a espessura até ao limite interno do EPR (Legarreta *et al.* 2008), enquanto o OCT Spectralis SD inclui o EPR na espessura da retina, e mede a espessura até á membrana de Bruch (Menke, Dabov, Knecht, *et al.* 2009; Grover *et al.* 2009; Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009). Figura 12

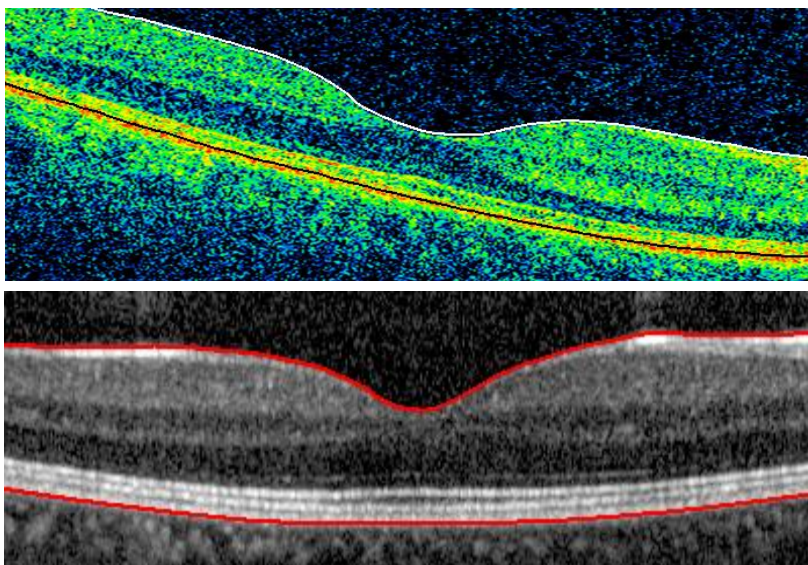


Figura 12. OCT SD, linhas de segmentação do *software* para cálculo da espessura da retina.

Em cima: OCT Cirrus; segmentação ao nível da interface vitreoretiniana (bordo interno) e limite interno do EPR (bordo externo); em baixo: OCT Spectralis; segmentação ao nível da interface vitreoretiniana (bordo interno) e membrana de Bruch (bordo externo).



Em consequência, o OCT Stratus obtém valores de espessura menores, quando comparado com os sistemas SD (Han & Jaffe 2009; Leung *et al.* 2008; Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009; Forte *et al.* 2009; Grover *et al.* 2010; Legarreta *et al.* 2008; Carpineto *et al.* 2010). Alguns instrumentos permitem correção manual da segmentação automática.

As diferenças entre os sistemas incluem, para além desta diferença de segmentação, diferente velocidade de aquisição dos *scans* e de resolução, e diferenças no protocolo de aquisição das imagens (Legarreta *et al.* 2008).

Para medição da espessura macular com o OCT Stratus TD usa-se mais frequentemente o protocolo *fast macular thickness*, que utiliza um padrão de 6 linhas radiárias (6 mm de comprimento), centradas na fóvea, com orientação angular de 30° entre elas, e em que cada linha consiste em 128 *A-scans*. Com este protocolo, fora da área macular central, existe muita interpolação e estimativa dos valores de espessura da retina entre os 6 *scans*. Os sistemas SD usam padrões de *scans* retangulares, de que resulta uma densidade uniforme de *A-scans* na área analisada, embora o número de *A-scans* varie consideravelmente entre os instrumentos: cerca de 27 000 (por segundo) no Cirrus e 40 000 (por segundo) no Spectralis.

O OCT Cirrus realiza padrões de *scans* lineares, numa área macular quadrada com 6 mm, denominados *macular cube*. Existe o *macular cube* 200X200, que compreende 200 *scans* lineares horizontais, cada um composto por 200 *A-scans* (Kakinoki *et al.* 2009; Kakinoki *et al.* 2012), e o *macular cube* 512X128, que compreende 128 *scans* lineares horizontais, cada um composto por 512 *A-scans* (Menke, Dabov & Sturm 2009; Giammaria *et al.* 2011; Patel *et al.* 2013). O padrão 512X128 tem melhor resolução, mas as linhas estão mais distanciadas. No nosso centro é normalmente usado o protocolo *macular cube* 512X128, associado à obtenção de 2 *scans* lineares, obtidos a 90° e a 180°.

Com o OCT Spectralis, as imagens para estudo da retina podem ser geradas por múltiplos protocolos de aquisição (*automatic real time, fast, dense, detail, posterior*

*pole, 7 lines*), que utilizam vários padrões de *scans*. Para obtenção do mapa de espessura da retina, utiliza-se o padrão *volume scan*, que compreende várias combinações possíveis de *scans*, que diferem no número de secções, distância entre secções, resolução, rapidez de aquisição. O OCT Spectralis compreende, também, padrões de *scans* lineares e em estrela, ou seja, radiários, centrados na fóvea, com orientação angular entre *scans* idêntica, no qual o número de *scans* é modificável. Por exemplo, no nosso centro, usa-se normalmente o padrão de *volume scan*, que realiza 49 *B-scans* (768 *A-scans/B-scan*), distanciados 120 µm, numa área de 20°X20°, associado a um padrão em estrela.

O *software* de cada sistema permite depois a obtenção dos valores médios de espessura da retina no mapa macular tipo ETDRS, composto por 3 círculos concêntricos (subdivididos num total de 9 áreas), com diâmetros de 1, 3 e 6 mm. O sistema de OCT Spectralis fornece, tal como o OCT Stratus, um valor de espessura no ponto central da fóvea, CPT, quando se realizam os padrões *volume scan*. No entanto, com os sistemas SD utiliza-se preferentemente o valor de CST, obtido pela média de várias medições da espessura da retina efetuadas na área macular central com 1000 µm de diâmetro, para correlação com a AV central. O valor de CST parece ser menos suscetível aos erros de medição do aparelho e mais reproduzível que o valor de CPT (Krzystolik *et al.* 2007; Chan & Duker 2005).

A medição da espessura da retina com sistemas SD tem sido considerada mais precisa e fidedigna do que com os sistemas TD (Kakinoki *et al.* 2009; Giammaria *et al.* 2011).

Como exposto, as medições com sistemas SD são superiores às medições com os TD, provavelmente refletindo a maior resolução axial, maior precisão do *software* e diferente segmentação nas camadas externas da retina, diferentes protocolos de aquisição e maior velocidade de aquisição (Ibrahim *et al.* 2012).

Na literatura, existem vários estudos que reportam medições da espessura da retina adquiridas com os sistemas TD (Stratus) e com os sistemas SD, em indivíduos

normais e com EMD; alguns destes estudos utilizam ambos os sistemas no mesmo grupo de doentes com patologia e em grupos normais para os comparar.

### **Espessura da Retina Normal com sistemas SD**

Os valores de espessura da retina diferem entre os sistemas TD e SD e entre os vários sistemas SD. Face ao uso crescente dos sistemas SD, torna-se necessário criar bases normativas com valores médios de espessura da retina obtidos em grupos de indivíduos normais (valores referência) para estes sistemas, e para cada sistema de OCT em particular.

Em grupos de indivíduos normais analisados com o OCT Cirrus foram descritos, por vários autores, valores médios de CST ( $\pm$  DP) que variam entre  $257.6 \pm 19.6$  (por Kakinoki et al.)  $\mu\text{m}$  a  $276 \pm 17$   $\mu\text{m}$  (por Wolf-Schnurrbusch et al.), como se mostra no quadro 3 (Legarreta et al. 2008; Wolf-Schnurrbusch et al. 2009; Kakinoki et al. 2009; Menke, Dabov & Sturm 2009).

No quadro 3 são também referidos os valores da base normativa da Zeiss, o produtor do sistema de OCT Cirrus, calculados num grupo de 282 indivíduos normais, acedidos através da página da internet da Zeiss e em <http://www.meditec.zeiss.com>, cujo intervalo referência de valor de CST varia entre 220.5 e 294.8, sem menção de diferença entre homens e mulheres.

No nosso centro foi recentemente calculada uma base normativa com o OCT Cirrus (AR Santos, comunicação pessoal, dados não publicados). Os valores normais foram adquiridos em 62 olhos de indivíduos saudáveis, com exame oftalmológico normal. Globalmente, obtiveram-se valores médios de espessura da retina no campo macular central (CST) de  $260 \pm 20$   $\mu\text{m}$ ; quando analisados pelo sexo, observou-se uma diferença estatisticamente significativa no valor médio de CST entre homens e mulheres ( $271.5 \pm 16.2$   $\mu\text{m}$  versus  $248.1 \pm 16.8$   $\mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ , respetivamente). A estes valores correspondem os seguintes intervalos referência (média  $\pm$  2 DP) de CST: globais: 220 – 300  $\mu\text{m}$ ; nos homens: 239 – 304  $\mu\text{m}$ ; nas mulheres: 215 – 282  $\mu\text{m}$ .

Usando o OCT Cirrus, o intervalo referência de espessura da retina normal na área macular central que estabelecemos no nosso centro é idêntico ao intervalo referência incluído no sistema Zeiss, e concordante com as observações de outros autores.

Globalmente, considerando todos os estudos referidos com o OCT Cirrus, os valores referência de CST (campo macular central com 1000  $\mu\text{m}$  de diâmetro) variaram entre um valor mínimo de 218  $\mu\text{m}$  e um valor máximo de 312  $\mu\text{m}$ .

Com o OCT Spectralis SD, também em grupos de indivíduos normais, Grover *et al.* encontraram, um valor médio ( $\pm$  DP) de CPT de  $227.3 \pm 23.2 \mu\text{m}$  e de CST de  $270.2 \pm 22.5 \mu\text{m}$  (N = 50) (Grover *et al.* 2009). Com base nestes valores, os autores propuseram um intervalo referência (valor médio  $\pm$  2 DP) de espessura de CST entre 225 a 315  $\mu\text{m}$ , quando se usa o OCT Spectralis (Grover *et al.* 2009). Outros autores avaliaram a espessura da retina em indivíduos normais com o OCT Spectralis, e encontraram valores ligeiramente diferentes, como se apresenta no quadro 3 (Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009; Grover *et al.* 2010; Ibrahim *et al.* 2012). Conjuntamente, foram reportadas medições da espessura da retina na área macular central a que correspondem intervalos de referência (média  $\pm$  2 DP) que variaram (valores mínimo e máximo, respetivamente), para CPT, entre 181 e 274, e para CST, entre 224 e 320  $\mu\text{m}$  (ver também quadro resumo 5).

Quadro 3. Espessura da retina normal, OCT SD.

OCT SD NORMAIS	N	CPT ± DP REF.	CST ± DP REF.
<b>CIRRUS SD</b>			
Legarreta <i>et al.</i> , 2008 (Legarreta <i>et al.</i> 2008)	50		266.2 ± 22.7 <b>221 - 312</b>
Wolf-Schnurrbusch <i>et al.</i> , 2009 (Wolf-Schnurrbusch <i>et al.</i> 2009)	20		276 ± 17 <b>242 - 310</b>
Menke <i>et al.</i> , 2009 (Menke, Dabov & Sturm 2009)	28		266 ± 20 <b>226 - 306</b>
Kakinoki <i>et al.</i> , 2009 (Kakinoki <i>et al.</i> 2009)	50		257.6 ± 19.6 <b>218 - 297</b>
<b>Base Normativa Zeiss (<a href="http://www.meditec.zeiss.com">http://www.meditec.zeiss.com</a>)</b>	282		257.7 ± 18.6 <b>220.5 – 294.8</b>
Base Normativa Cirrus do centro (AR Santos, 2013, dados não publicados)	62		260 ± 20 <b>220 – 300</b>
			H: 271.5 ± 16.2* <b>H:239 - 304</b>
			M: 248.1 ± 16.8* <b>M: 215 - 282</b>
<b>Valores referência globais - Mínimo e máximo</b>			<b>218 - 312</b>
<b>SPECTRALIS SD</b>			
Grover <i>et al.</i> , 2009 (Grover <i>et al.</i> 2009)	50	227.3 ± 23.2	270.2 ± 22.5
		<b>181 - 274</b>	<b>225 - 315</b>
Wolf-Schnurrbusch <i>et al.</i> , 2009 (Wolf-Schnurrbusch <i>et al.</i> 2009)	20		288 ± 16
			<b>256 - 320</b>
Grover <i>et al.</i> , 2010 (Grover <i>et al.</i> 2010)	36	225.1 ± 17.1	271.4 ± 19.6
		<b>191 - 259</b>	<b>232 - 311</b>
Ibrahim <i>et al.</i> , 2012 (Ibrahim <i>et al.</i> 2012)	80		266 ± 21
			<b>224 - 308</b>
<b>Valores referência globais - Mínimo e máximo</b>		<b>181 - 274</b>	<b>224 - 320</b>

Valores médios de espessura da retina e desvio padrão (DP), em  $\mu\text{m}$ , e valores referência (média  $\pm$  2 DP), em  $\mu\text{m}$ , obtidos em indivíduos normais, com os sistemas de OCT SD, Cirrus e Spectralis, no ponto central da fóvea (CPT) e na área macular central com diâmetro de 1000  $\mu\text{m}$  (CST). \* - diferença estatisticamente significativa entre homens e mulheres.

OCT – optical coherence tomography; SD – *spectral-domain*; N – número; CPT – *central point thickness*; DP – desvio padrão; REF. – valores referência; CST – *central subfield thickness*; H – homens, M – mulheres.

Presentemente, face ao uso crescente dos sistemas SD, tornou-se necessário e essencial, na prática clínica e na investigação, estabelecer uma correlação entre os sistemas TD e SD. A possibilidade de relacionar as medições efetuadas com os 2 tipos de sistemas permite aplicar a informação previamente adquirida, e o seguimento de doentes avaliados anteriormente com os sistemas de OCT TD.

Alguns dos estudos já mencionados, entre outros, realizaram avaliações sequenciais da espessura da retina em indivíduos normais com os 2 sistemas, TD e SD, por forma a comparar as duas metodologias e realçar (eventuais) diferenças entre elas.

#### Quadro 4

Estudos comparativos entre o OCT Stratus TD e o OCT Cirrus SD encontraram diferenças de espessura entre os métodos de 50  $\mu\text{m}$  (diferença de  $62.3 \pm 7.3 \mu\text{m}$  no valor de CST) (Legarreta *et al.* 2008); 60  $\mu\text{m}$  (Kakinoki *et al.* 2009); e de 43  $\mu\text{m}$  (52  $\mu\text{m}$  no valor de CST) (Menke, Dabov & Sturm 2009).

Similarmente, a diferença entre o OCT Stratus TD e OCT Spectralis SD também foi avaliada. Em 2010, Grover *et al.* mediram a espessura da retina em 36 indivíduos normais, na mesma sessão, com os 2 sistemas, TD e SD (Grover *et al.* 2010). Obtiveram com o OCT Stratus valores de CPT de  $166.9 \pm 20.9 \mu\text{m}$  e de CST de  $202.3 \pm 19.6 \mu\text{m}$ ; com o OCT Spectralis obtiveram um valor médio de CPT de  $225.1 \pm 17.1 \mu\text{m}$  e de CST de  $271.4 \pm 19.6 \mu\text{m}$ . Constataram uma diferença de espessura no campo macular central entre os 2 métodos de quase 70  $\mu\text{m}$ , e que variou entre 61.9 a 74  $\mu\text{m}$ , nos outros 8 campos ETDRS. Ibrahim *et al.* observaram uma diferença no valor de CST de 78  $\mu\text{m}$ , e, em geral, uma diferença média de 76  $\mu\text{m}$  (Ibrahim *et al.* 2012).

Com base nas medições que fizeram em indivíduos normais, Ibrahim *et al.* deduziram uma equação de conversão entre os 2 sistemas, que consiste em:  $y=1.029x + 72.49$ , na qual "y" é o valor de espessura no sistema Spectralis e "x" o valor no sistema Stratus (Ibrahim *et al.* 2012). Os autores assumiram que esta equação poderá não ser adequada para a conversão entre Stratus e outros sistemas SD, que não o Spectralis, e poderá não ser aplicável a pontos afastados da fóvea. Curiosamente, com

base nesta equação, ao valor de CST de 250  $\mu\text{m}$ , obtido com o OCT Stratus, usado como critério de elegibilidade e re-tratamento em protocolos de ensaios clínicos na RD/EMD, corresponderá um valor no OCT Spectralis de 330  $\mu\text{m}$  (Ibrahim *et al.* 2012).

Estes estudos comparativos também têm mostrado uma forte correlação entre os sistemas TD e SD, nas medições de espessura em indivíduos normais, entre Stratus e Cirrus (Legarreta *et al.* 2008; Kakinoki *et al.* 2009) ou Stratus e Spectralis (Grover *et al.* 2010; Ibrahim *et al.* 2012; Carpineto *et al.* 2010). Os sistemas SD parecem ter, no entanto, melhor reprodutibilidade (Leung *et al.* 2008).

Considerando as diferenças entre os vários sistemas de OCT reportados na literatura, constatados nos nossos estudos e que observamos diariamente na prática clínica, temos assumido no nosso centro uma diferença entre Stratus e Cirrus de 50  $\mu\text{m}$  e entre Stratus e Spectralis de 70  $\mu\text{m}$ .

Quadro 4. Espessura da retina normal, estudos de comparação entre sistemas de OCT TD e SD.

NORMAIS, TD versus SD	OCT	CPT $\pm$ DP	CST $\pm$ DP	SD / TD
<b>CIRRUS SD</b>				
Legarreta <i>et al.</i> , 2008 (Legarreta <i>et al.</i> 2008)	TD - Stratus		203.9 $\pm$ 20	62.3 $\pm$ 7.3
	SD - Cirrus		266.2 $\pm$ 22.7	50*
Kakinoki <i>et al.</i> , 2009 (Kakinoki <i>et al.</i> 2009)	TD - Stratus		197.2 $\pm$ 17.8	60
	SD - Cirrus		257.6 $\pm$ 19.6	
<b>SPECTRALIS SD</b>				
Grover <i>et al.</i> , 2010 (Grover <i>et al.</i> 2010)	TD - Stratus	166.9 $\pm$ 20.9	202.3 $\pm$ 19.6	69.1
	SD - Spectralis	225.1 $\pm$ 17.1	271.4 $\pm$ 19.6	70*
Ibrahim <i>et al.</i> , 2012 (Ibrahim <i>et al.</i> 2012)	TD - Stratus		188 $\pm$ 20	78
	SD - Spectralis		266 $\pm$ 21	

Estudos comparativos entre os sistemas de OCT TD e SD de valores médios de espessura da retina e desvio padrão (DP), em  $\mu\text{m}$ , obtidos em indivíduos normais.

\* - diferença entre TD e SD estimada pelos autores.

TD – *time-domain*; SD – *spectral-domain*; OCT – *optical coherence tomography*; CPT – *central point thickness*; DP – *desvio padrão*; CST – *central subfield thickness*.

### **Espessura da retina na RD/EMD**

Na RD, e em particular no EMD, a medição da espessura da retina com o OCT é um parâmetro indicativo da presença de edema e ponderado na decisão terapêutica, em associação a outros parâmetros, nomeadamente a morfologia intrarretiniana, também avaliada no OCT, valores de AV, e achados do fundo ocular/fotografia do fundo ocular. A medição da espessura da retina com o OCT permite, também, avaliar a progressão natural do edema, bem como, a resposta ao tratamento e decisão de nova intervenção.

O OCT tem sido incluído em todos os protocolos de ensaios clínicos na RD/EMD.

O OCT Stratus foi o sistema de OCT comercializado mais usado na última década, pelo que a maioria dos protocolos de estudos clínicos foram desenhados com base neste sistema. Assim aconteceu com vários protocolos de tratamento com agentes anti-VEGF intra-vítreos da forma exsudativa da degenerescência macular relacionada com a idade, de que são exemplo os estudos PrONTO (Lalwani *et al.* 2009), SUSTAIN (Holz *et al.* 2011), SAILOR (Boyer *et al.* 2009), IVAN (Chakravarthy *et al.* 2012), HORIZON (Singer *et al.* 2012) e CATT (Martin *et al.* 2011; Martin *et al.* 2012). No EMD o OCT Stratus também foi usado para monitorizar o efeito de vários protocolos terapêuticos, que incluíram a avaliação do tratamento laser, com corticosteroides ou agentes anti-VEGF intra-vítreos, de que são exemplo os estudos RESOLVE (Massin *et al.* 2010), READ-2 (Nguyen *et al.* 2009; Do *et al.* 2013), RISE e RIDE (Nguyen *et al.* 2012), RESTORE (Mitchell *et al.* 2011) e os estudos da rede DRCR.net (Elman *et al.* 2010; Elman *et al.* 2011; S. B. Bressler *et al.* 2012; Elman *et al.* 2012). Aliás, o DRCR.net introduziu o OCT SD nos protocolos de estudo a partir de 2009, inicialmente como alternativa ao OCT Stratus. Só em estudos mais recentes, ainda em fase de recrutamento, é que o OCT Stratus já não é incluído na metodologia. Os critérios de elegibilidade e tratamento nos protocolos do READ-2 e do DRCR.net definiram como valor “de corte” de espessura no campo macular central (1000 µm de diâmetro) um valor de 250 µm, ou seja, consideraram 250 µm o limiar superior de normalidade da espessura macular central (valor médio + 2 DP); os estudos RISE, RIDE e RESTORE



definiram um valor de “corte” de 275  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$  no estudo RESOLVE (Lam *et al.* 2007; Chew *et al.* 2007; Browning *et al.* 2007; Elman *et al.* 2010; S. B. Bressler *et al.* 2012).

Assim aconteceu, também, com o nosso estudo observacional, previamente descrito (N = 410), que iniciou a inclusão de doentes em 2007. Nesta altura, o OCT Stratus era o equipamento mais amplamente usado, e mais referenciado em publicações científicas, o que, adicionalmente, permitiria e facilitaria comparações com dados constantes na literatura. Optou-se, pois, por não adicionar um sistema de OCT SD, não previsto no protocolo inicial, com diferenças para o sistema TD na altura ainda não reconhecidas e, portanto, imprevisíveis, mas também porque este sistema surgiu, no nosso centro, em 2009, altura em que os primeiros doentes incluídos já tinham realizado a visita final.

Existe uma variabilidade significativa entre medições de espessura da retina obtidas com diferentes modelos de OCT, e em particular, entre medições efetuadas com sistemas TD e SD, em indivíduos normais, mas também com RD/EMD (Kakinoki *et al.* 2012; Lammer *et al.* 2011).

Nas fases iniciais da RD, Chalam *et al.*, num estudo da rede DRCR.net, obtiveram medições de espessura da retina numa mesma população de indivíduos diabéticos (N = 122 olhos), sem lesões de RD ou com lesões de RDNP ligeira, com o OCT Stratus e o OCT Spectralis (Chalam *et al.* 2012). À semelhança do estudo publicado em 2008 pela mesma rede (Bressler *et al.*, 2008, referido no quadro 2), numa população idêntica, mas usando o OCT Stratus, pretendiam agora estabelecer o nível de espessura da retina que permite diferenciar olhos de indivíduos diabéticos, com e sem edema, quando se usa o OCT Spectralis. Constataram, com o OCT Stratus, valores médios de CPT e CST de 167  $\mu\text{m}$  e 199  $\pm$  24  $\mu\text{m}$ , respetivamente; com o OCT Spectralis observaram valores médios de CPT de 227  $\pm$  25  $\mu\text{m}$  e de CST de 270  $\pm$  24  $\mu\text{m}$ , ou seja, uma diferença de aproximadamente 70  $\mu\text{m}$  entre os 2 sistemas no campo macular central. Observaram, também, uma diferença significativa de valor de CST entre

homens e mulheres ( $278 \pm 23 \mu\text{m}$  versus  $263 \pm 22 \mu\text{m}$ , respetivamente) (Chalam *et al.* 2012). Com base neste estudo, os autores propuseram valores limiares de espessura no campo macular central (valores de CST), acima dos quais o edema é considerado, medidos com o sistema Spectralis, para as mulheres  $\geq 305 \mu\text{m}$  e para os homens  $\geq 320 \mu\text{m}$  (aproximadamente 2 DP acima do valor médio). Efetivamente, estes são os valores limiares (de “corte”) para deteção de aumento da espessura no campo macular central, considerados em recentes protocolos de estudos do DRCR.net, quando se usa o OCT Spectralis. Ou seja, valores de CST  $\geq 305 \mu\text{m}$ , nas mulheres, e  $\geq 320 \mu\text{m}$ , nos homens, são utilizados como critério de inclusão em protocolos de estudos de tratamento do edema macular diabético com envolvimento do centro.

Similarmente, quando se utiliza o OCT Cirrus, o DRCR.net preconiza valores limiares de CST de  $290 \mu\text{m}$ , para as mulheres, e de  $305 \mu\text{m}$ , para os homens. Esta informação foi acedida através da página da internet do DRCR.net, consultando os protocolos de estudo (por exemplo, o protocolo NCT01909791).

Atualmente, em indivíduos diabéticos, o diagnóstico de edema da retina e a decisão de tratamento, inicial e durante o seguimento, baseiam-se, fundamentalmente, na conjugação dos achados da avaliação clínica (AV, fundoscopia), classificação das fotografias do fundo ocular e dados do OCT (quantitativos e morfológicos). Destas avaliações, a foografia do fundo ocular é o método que poderá não ser realizado sistematicamente, sobretudo quando se trata de exames de seguimento, após o diagnóstico inicial ter sido estabelecido.

Portanto, tornou-se essencial, por um lado, a definição de critérios que permitam presumir a presença da doença, sobretudo nas fases mais iniciais e/ou assintomáticas da evolução, bem como, avaliar sinais da sua atividade, quando se usa o OCT. Por outro lado, é igualmente importante a uniformização dos critérios usados por centros diferentes, incluindo o nosso, que realizam estudos em doentes com EMD, o que claramente facilita a comunicação entre investigadores, permite elaborar protocolos

de ensaios clínicos e comparar resultados entre centros diferentes e com os dados constantes na literatura.

Por este motivo, em doentes diabéticos, o EMD com envolvimento do centro é diagnosticado no nosso centro usando os valores de “corte” preconizados pelo DRCR.net.

Em doentes com EMD/EMCS também foram reportadas diferenças entre os sistemas TD e SD. Num estudo em 33 indivíduos com EMCS (N = 33 olhos), a discrepância entre o OCT Stratus e o OCT Cirrus foi aparente por uma alteração dos valores medidos que pode ir até 168  $\mu\text{m}$ , e diferenças médias nos subcampos que variam entre 30 a 55  $\mu\text{m}$  (Forooghian *et al.* 2008); outro estudo em doentes com EMD encontrou um valor médio de CST 45  $\mu\text{m}$  superior com o OCT Cirrus, em relação ao Stratus (Kakinoki *et al.* 2012). Ibrahim *et al.* analisaram, para além de um grupo normal como já referido, 130 olhos de 118 diabéticos com EMD, com o OCT Stratus e o OCT Spectralis. A equação de conversão que deduziram no grupo normal, permitiu converter valores de Stratus em Spectralis, que foram 5% mais elevados que as medições efetuadas nos diabéticos (Ibrahim *et al.* 2012). Em olhos com EMD observaram uma diferença de 61  $\mu\text{m}$  no campo macular central (CST) entre os 2 sistemas, inferior à diferença de 78  $\mu\text{m}$  que observaram no grupo normal. Previamente, Forte *et al.*, num grupo constituído por olhos normais, com edema macular e com alta miopia, observaram uma diferença entre os 2 sistemas de 30 a 39  $\mu\text{m}$  (antes e após correção de artefactos, respetivamente), e sugeriram um fator de correção de 1.1 para converter valores de Stratus para valores de SD-SLO/OCT (OTI, Toronto, Canada) (Forte *et al.* 2009). Lammer *et al.* compararam a espessura da retina em olhos com EMD entre o OCT Stratus e 3 sistemas SD, e observaram entre o OCT Stratus e o OCT Spectralis uma diferença de espessura que variou entre 62 a 93  $\mu\text{m}$  (Lammer *et al.* 2011). Reportaram também uma diferença nas medições de espessura entre Cirrus e Spectralis de 19  $\mu\text{m}$ , e entre Spectralis e 3D OCT de 55  $\mu\text{m}$  (Lammer *et al.* 2011). Patel *et al.* encontraram, em olhos com EMD, uma diferença de 50  $\mu\text{m}$  entre Stratus e Cirrus no campo macular central (Patel *et al.* 2013).

Estudos em doentes diabéticos com EMD utilizando os 2 sistemas, TD e SD, observaram, no entanto, boa correlação entre as medições da espessura adquiridas com os 2 sistemas, tendo sido reportados coeficientes de correlação de 0.977 (Kakinoki *et al.* 2012) e 0.99 (Ibrahim *et al.* 2012).

Os sistemas de OCT SD, com maior resolução, também têm permitido a segmentação das camadas da retina. Desta forma, tem sido possível a quantificação individual da espessura e a avaliação qualitativa de lesões nas várias camadas. Num estudo em olhos com EMD submetidos a vitrectomia, Murakami *et al.* observaram que a espessura das camadas internas se correlacionava positivamente com a perda visual, enquanto a espessura das camadas externas se associava negativamente com o prognóstico visual (Murakami, Nishijima, *et al.* 2012b).

### **Reprodutibilidade dos sistemas SD**

Wolf-Schnurrbusch *et al.* compararam, na mesma sessão, medições de espessura da retina adquiridas com 6 sistemas diferentes de OCT, um TD (Stratus) e 5 SD. Observaram coeficientes de variação de 3.33% com o Stratus, 0.46% com o Spectralis e 3.09% com o Cirrus (Wolf-Schnurrbusch *et al.* 2009). Em consonância, Menke *et al.* reportaram, em indivíduos normais avaliados com o OCT Spectralis, excelente reprodutibilidade intra-observador, com resultados idênticos entre 3 medições diferentes de espessura da retina realizadas pelo mesmo operador na mesma sessão (Menke, Dabov, Knecht, *et al.* 2009). Ibrahim *et al.* observaram no seu estudo comparativo entre o OCT Stratus TD e o OCT Spectralis SD, em indivíduos normais, um coeficiente de repetibilidade da espessura da retina no campo macular central de 17  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ , respetivamente (Ibrahim *et al.* 2012). Os sistemas SD parecem ter uma reprodutibilidade superior à do OCT Stratus (Carpineto *et al.* 2010; Leung *et al.* 2008), ainda que uma forte correlação entre medições com Stratus e sistemas SD seja observada (Carpineto *et al.* 2010).

## Conclusões

Nos últimos anos, o OCT tornou-se numa metodologia amplamente e crescentemente usada, na prática clínica e em investigação, para aquisição de valores de espessura da retina no estudo da patologia da retina, e muito em particular no EMD, mas também para a avaliação de indivíduos normais.

Em indivíduos normais encontramos na literatura valores de espessura da retina diferentes e variáveis, quer quando medidos com o mesmo sistema de OCT ou sistemas diferentes, TD ou SD, provavelmente refletindo diferenças entre os métodos de aquisição usados, mas também, diferenças nos grupos de indivíduos incluídos, quanto ao número, etnia, sexo, refração. Sabemos, também, que as características dos vários sistemas de OCT variam, no que diz respeito à segmentação, velocidade de aquisição, resolução axial e protocolo de aquisição dos *scans*.

O estabelecimento de bases normativas é essencial para determinar, no contexto de patologia, eventual aumento ou diminuição da espessura da retina, em particular nas fases mais iniciais da doença, ainda assintomáticas, e para decisões de tratamento. As bases normativas ajudam no desenho e interpretação de ensaios clínicos que avaliam o EMD. No entanto, face às diferenças registadas entre os vários sistemas, terão de ser calculadas para cada aparelho em particular.

O cálculo dos limites de normalidade (valores de “corte”), ou seja, valores de referência, tem sido mais frequentemente baseado na determinação do valor médio  $\pm$  2 DP. Assim, seguindo este raciocínio, entre as publicações referidas no quadro 1, olhando para os valores referência, constatamos os seguintes valores, mínimo e máximo, de CPT e CST obtidos com o OCT Stratus TD:

- OCT Stratus, TD
  - CPT
    - Valor mínimo – 118  $\mu$ m
    - Valor máximo – 230  $\mu$ m

- Intervalo referência calculado pelo nosso grupo de investigação – 130 – 210  $\mu\text{m}$

Os valores referência de CPT que calculámos com o OCT Stratus numa população normal, e tendo em conta a variabilidade que se encontra na literatura, parecem estar de acordo com os valores observados por outros autores.

– CST

- Valor mínimo – 163  $\mu\text{m}$
- Valor máximo – 252  $\mu\text{m}$
- Intervalo referência calculado pelo nosso grupo de investigação – 160 – 240  $\mu\text{m}$

No campo macular central, área central com 1000  $\mu\text{m}$  de diâmetro, os valores referência de CST calculados com o OCT Stratus são, também, concordantes com as medições reportadas na literatura. Inclusivamente, quando comparámos a nossa base normativa com a base normativa do sistema Zeiss (o produtor do sistema de OCT Stratus) não encontramos diferenças significativas. Podemos pois assumir os 2 intervalos de referência que calculámos com o OCT Stratus num grupo de indivíduos normais, entre 130 a 210  $\mu\text{m}$ , para CPT, e entre 160 a 240  $\mu\text{m}$ , para CST.

Por outro lado, face ao uso crescente na atividade clínica e investigação dos sistemas SD, e às diferenças que se têm observado para o sistema TD, nomeadamente aquisição de valores superiores, tornou-se essencial criar novos valores de referência com os sistemas SD e, adicionalmente, tentar comparar os novos sistemas SD com os TD mais antigos, para poder continuar a seguir adequadamente os doentes que realizaram o OCT TD.

Embora com alguma controvérsia, e abordagem distinta por diferentes autores, a espessura da retina pode variar com a idade, etnia, comprimento axial, mas, mais consensualmente na literatura, com o sexo. Os homens parecem ter retinas mais

espessas que as mulheres, e esta diferença não poderá ser ignorada, sobretudo na altura de inclusão em protocolos de ensaios clínicos.

Os sistemas SD adquirem valores de espessura da retina superiores aos sistemas TD. Por outro lado, os valores entre diferentes sistemas SD, nomeadamente o OCT Cirrus e o OCT Spectralis também são diferentes, maiores com o Spectralis, provavelmente refletindo a diferente segmentação na retina externa: o OCT Cirrus mede a espessura da retina até ao EPR, enquanto o OCT Spectralis mede a espessura da retina até à membrana de Bruch.

A observação de dados quantitativos reportados por alguns autores, constantes no quadro 3, permite calcular os valores referência de espessura da retina normal (média  $\pm$  2 DP), para os sistemas SD Cirrus e Spectralis, cujos limites, mínimo e máximo, são:

- OCT Cirrus, SD
  - CST
    - Valor mínimo – 218  $\mu$ m
    - Valor máximo – 312  $\mu$ m
    - Intervalo referência calculado pelo nosso grupo de investigação
      - Global – 220 – 300  $\mu$ m
      - Homens – 239 – 304  $\mu$ m
      - Mulheres – 215 - 282  $\mu$ m
- OCT Spectralis, SD
  - CPT
    - Valor mínimo – 181  $\mu$ m
    - Valor máximo – 274  $\mu$ m
  - CST
    - Valor mínimo – 224  $\mu$ m
    - Valor máximo – 320  $\mu$ m

Com o OCT Cirrus, os valores reportados de CST (na literatura e nossos) variam entre um mínimo de 218 e um máximo de 312  $\mu\text{m}$ .

Os valores de CST da base normativa calculados no nosso centro com o OCT Cirrus SD variam, globalmente, entre 220 e 300  $\mu\text{m}$ ; nos homens, entre 239 e 304  $\mu\text{m}$ , e nas mulheres, entre 215 e 282  $\mu\text{m}$ , concordantes com os valores da base normativa da Zeiss e com os valores descritos por outros autores.

A espessura da retina normal adquirida com o sistema de OCT Spectralis pode variar entre 181 e 274  $\mu\text{m}$ , valores de CPT, e entre 224 e 320  $\mu\text{m}$ , valores de CST.

Vários estudos comparativos realizados em indivíduos normais (e também em diabéticos) têm tentado estabelecer a diferença entre os sistemas TD e SD, tendo sido reportadas, no campo macular central (CST), diferenças de 50 a 60  $\mu\text{m}$ , entre Stratus e Cirrus, e de 70 a 78  $\mu\text{m}$ , entre Stratus e Spectralis.

Assim, na área macular central, com base nestes dados, na comparação entre os nossos valores normais com o OCT Stratus e o OCT Cirrus e os valores referidos na literatura, e valores que temos constatado na nossa experiência quotidiana clínica, temos assumido uma diferença aproximada entre Stratus e Cirrus de 50  $\mu\text{m}$  e entre Stratus e Spectralis de 70  $\mu\text{m}$ .

Nas fases iniciais da RD os valores de espessura da retina determinados por vários autores (quadro 2) têm originado diferentes conclusões, com alguma controvérsia. Perante a comparação com as bases normativas usadas pelos autores, nas fases iniciais da RD, em doentes sem lesões de RD (nível 10 ETDRS) ou com lesões de RDNP ligeira (níveis 20 e 35 ETDRS), foram descritos valores médios de espessura da retina sem diferença significativa para o grupo controlo; valores diminuídos de espessura da retina face aos valores normais, atribuídos à degeneração neuronal precoce que ocorre na RD; ou valores aumentados, em média, como constatado no trabalho realizado pelo nosso grupo de investigação, aumento que atribuímos à rutura precoce da BHR interna que ocorre na RD.



Vários ensaios clínicos na RD, protocolos de tratamento do EMD, definiram o valor de CST de 250  $\mu\text{m}$  com o OCT Stratus como indicador de edema macular com envolvimento do centro e critério de inclusão e tratamento, de que são exemplo os estudos READ-2 e da rede DRCR.net.

Em 2012, Chalam *et al.*/DRCR.net realizaram um estudo idêntico ao realizado em 2008, em doentes com DM, sem lesões de RD/RDNP ligeira (N = 122), e mediram a espessura da retina com o OCT Stratus (dados no quadro 2) e com o OCT Spectralis. Com o sistema SD encontraram valores médios de CPT de  $227 \pm 25 \mu\text{m}$  e de CST de  $270 \pm 24 \mu\text{m}$ , ou seja, uma diferença de 70  $\mu\text{m}$  no campo macular central. Observaram, também, uma diferença significativa da espessura com o sexo (maior nos homens). Propuseram valores de “corte” de espessura na área macular central, para deteção de edema com envolvimento do centro em indivíduos diabéticos, que correspondem, nas mulheres a  $\text{CST} \geq 305 \mu\text{m}$ , e nos homens  $\text{CST} \geq 320 \mu\text{m}$  (aproximadamente valor médio  $\pm 2 \text{ DP}$ ). Estes valores são considerados nos protocolos do DRCR.net.

Com o OCT Cirrus, os valores de “corte” de CST considerados pelo DRCR.net são, nas mulheres  $\text{CST} \geq 290 \mu\text{m}$ , e nos homens  $\text{CST} \geq 305 \mu\text{m}$ . Estes valores são referenciados como “equivalentes” ao valor de 250  $\mu\text{m}$  medido com o OCT Stratus, previamente considerado.

Estes valores foram adotados no nosso centro como indicadores de edema macular com envolvimento do centro, em diabéticos, quando se usam os sistemas SD, Spectralis ou Cirrus.

O EMD subclínico é definido como um aumento da espessura da retina macular central detetado em exames objetivos, como o OCT, mas clinicamente não detetado. Desde a introdução do OCT, que permitiu a medição objetiva da espessura da retina, que o EMD subclínico é referido por alguns autores em doentes diabéticos, em particular nas fases mais iniciais da doença, embora a sua história natural, eventuais implicações e associação com fatores oculares e/ou sistémicos tenha sido, até à algum tempo, não abordada e, portanto, largamente desconhecida. Assim, os valores/limites

da espessura da retina (obtidos com o OCT) que permitem a sua caracterização só foram definidos, mais recentemente, pelo DRCR.net. Este grupo definiu EMD subclínico pela ausência de edema, no exame clínico na lâmpada de fenda, associada a um valor de CPT medido com o OCT Stratus  $\geq 225 \mu\text{m}$  e  $\leq 299 \mu\text{m}$  (N. M. Bressler *et al.* 2012). O limiar inferior de espessura da retina,  $225 \mu\text{m}$ , foi estabelecido com base no estudo do DRCR.net de 2008 (referenciado no quadro 2), e o limiar superior da definição,  $299 \mu\text{m}$ , correspondeu ao que Brown *et al.* previamente consideraram o limiar da deteção clínica de espessamento da retina (Brown *et al.* 2004).

Utilizámos esta definição para realizar um estudo observacional do EMD subclínico durante 2 anos, no decurso do qual percebemos que a presença de EMD subclínico, e o mau controlo metabólico, se associavam a um aumento do risco de progressão da RD para EMCS.

O uso recente e mais generalizado dos sistemas SD lançou o desafio, e a necessidade, de caracterizar o EMD subclínico com parâmetros adaptados aos novos sistemas de OCT.

É importante notar que, o valor de CST é atualmente a referência clínica mais usada em ensaios clínicos que estudam o EMD com envolvimento do centro (Browning, Glassman, *et al.* 2008), e que, embora exista uma alta correlação entre CPT e CST (Browning *et al.* 2007; Davis *et al.* 2008), o valor de CST é menos suscetível aos erros de medição do aparelho e mais reprodutível (Krzystolik *et al.* 2007; Chan & Duker 2005). Portanto, presentemente, deixou de fazer sentido referir o valor de CPT. É usado o valor de CST, que representa a média dos valores de espessura da retina obtidos na área macular central com  $1000 \mu\text{m}$  de diâmetro, e que portanto se correlaciona com a AV.

Não existem estudos de correspondência entre um valor de espessura da retina, determinada pelo OCT SD, e o limiar de deteção clínica de aumento da espessura macular, em analogia ao estudo de Brown *et al.* No entanto, o paradigma do diagnóstico de edema macular com indicação para tratamento (inclusão em protocolos

de estudos clínicos de tratamento) baseia-se, cada vez mais, na deteção objetiva de edema macular com envolvimento do centro, usando o OCT, e os valores limiares de espessura propostos pelo DRCR.net. Assim, estes valores, atualmente aceites como critério da presença de edema na área macular central, poderão constituir, efetivamente, o limiar que faz a transição entre uma forma de edema “subclínico” para o edema “clínico”. Assim, seguindo este raciocínio, no intervalo de espessura que vai definir o edema subclínico, o limiar superior vai corresponder a valores de CST que são, quando medidos com o OCT Cirrus,  $\geq 305 \mu\text{m}$  nos homens, e  $\geq 290 \mu\text{m}$  nas mulheres; quando medidos com o OCT Spectralis,  $\geq 320 \mu\text{m}$  nos homens, e  $\geq 305 \mu\text{m}$  nas mulheres. O limiar inferior é mais arbitrariamente definido. Propomos que corresponda ao valor médio da espessura da retina subtraído de 1 DP. Quando se usa o OCT Spectralis, irá corresponder a um valor de aproximadamente  $250 \mu\text{m}$ , calculado com base no estudo de Chalam *et al.* ( $270 - 24 = 246 \mu\text{m}$ ); quando se usa o OCT Cirrus, irá corresponder a um valor de aproximadamente  $240 \mu\text{m}$ , que se obtém com base nos valores da base normativa da Zeiss (e também nos valores que obtivemos num grupo normal) ( $257.7 - 18.6 = 239.1 \mu\text{m}$ ).

Por fim, no que diz respeito à prática clínica e decisão terapêutica, a comparação entre os sistemas TD e SD também tem evidenciado algumas diferenças. Em doentes com degenerescência macular relacionada com a idade foi demonstrado que o OCT Cirrus deteta fluido intra e subretiniano mais frequentemente que o OCT Stratus, achado com implicação no planeamento da intervenção terapêutica e nos resultados observados (Cukras *et al.* 2010). No EMD, um estudo recente de Liu *et al.* avaliou o impacto do uso dos dois sistemas de OCT, TD seguido de SD, na decisão do investigador para intervenção terapêutica com anti-VEGF em olhos com EMD (Liu *et al.* 2014). Neste estudo, que incluiu doentes com diabetes tipo 1 ou 2 e EMD, os autores constataram que a adição do sistema SD aumentou a certeza da necessidade de tratamento com agentes anti-VEGF em 36% dos casos. A maioria das decisões não concordantes tendia a recomendar mais tratamento com anti-VEGF após a visualização do OCT SD, achado que os autores atribuíram à maior sensibilidade dos sistemas SD para detetar patologia da retina (Liu *et al.* 2014).

Quadro 5 – Conclusões. Valores de espessura da retina em  $\mu\text{m}$ .

<b>CONCLUSÕES</b>			
<b>Normais - Valores referência</b>			
		<b>Literatura</b>	<b>Nossos</b>
<b>Stratus</b>	<b>CPT</b>	118 - 230	130 - 240
	<b>CST</b>	163 - 252	160 - 240
<b>Cirrus SD</b>	<b>CST</b>	218 - 312	220 - 300
			H: 239 - 304
			M: 215 - 282
<b>Spectralis SD</b>	<b>CPT</b>	181 - 274	
	<b>CST</b>	224 - 320	
<b>Diferença TD / SD</b>		<b>Literatura</b>	
<b>Stratus / Cirrus</b>		50 - 60	50
<b>Stratus / Spectralis</b>		70 - 76	70
<b>Aumento espessura CST</b>		<b>DRCR.net</b>	
<b>Stratus</b>		$\geq 250$	$\geq 240$
<b>Cirrus</b>			$\geq 300$
		<b>H: <math>\geq 305</math></b>	H: $\geq 304$
		<b>M: <math>\geq 290</math></b>	M: $\geq 282$
<b>Spectralis</b>			
		<b>H: <math>\geq 320</math></b>	
		<b>M: <math>\geq 305</math></b>	
<b>Edema Macular Diabético Subclínico</b>			
<b>Stratus</b>	<b>CPT</b>	<b>225 - 299</b>	<b>225 - 299</b>
<b>Cirrus</b>	<b>CST</b>		<b>H: 240 - 305</b>
			<b>M: 240 - 290</b>
<b>Spectralis</b>	<b>CST</b>		<b>H: 250 - 320</b>
			<b>H: 250 - 305</b>

\* coluna a cinzento com valores obtidos/calculados pelo nosso grupo de investigação.

#### 4.6.4.4. Alterações Morfológicas no EMD

O OCT permite a obtenção de imagens da estrutura do vítreo, retina e coróideia, semelhantes a uma secção histológica, que não podem ser obtidas por outras técnicas diagnósticas não invasivas (Drexler & Fujimoto 2008; Spaide 2009; Toth *et al.* 1997; Hee, Izatt, *et al.* 1995).

No EMD as alterações estruturais da retina foram classificadas no OCT TD por vários autores em padrões morfológicos específicos (Kang *et al.* 2004; Otani *et al.* 1999; Kim *et al.* 2006; Kim *et al.* 2009). Coletivamente, estes autores descreveram 5 padrões de alterações estruturais associadas ao EMD, que consistiram em aumento difuso da espessura da retina (tipo “esponja”), edema macular cistoide, descolamento seroso da retina, anomalias da interface vitreomacular e descolamento tracional da retina (Otani *et al.* 1999; Kim *et al.* 2006; Kang *et al.* 2004; Ozdek *et al.* 2005; Kim *et al.* 2009).

O aumento difuso da espessura da retina, de entre todos o mais prevalente, foi descrito em 55.2% a 97% dos olhos com EMD (Kang *et al.* 2004; Kim *et al.* 2006) (prevalência de 88% na série de Otani *et al.* (Otani *et al.* 1999)), e é observado no OCT como um aumento da espessura da retina associado a diminuição da refletividade ótica intrarretiniana. Os sistemas de OCT SD, com melhor resolução, têm mostrado que pequenos espaços cistoides (microcistoides) intrarretinianos podem efetivamente surgir neste tipo de edema, não visualizados com os antigos sistemas de OCT TD (Byeon *et al.* 2012). Olhos com este padrão de EMD têm, em geral, melhor AV que olhos com outros padrões (edema macular cistoide, fluido subretiniano ou anomalias da interface vitreomacular) (Yamamoto *et al.* 2001; Alkuraya *et al.* 2005; Kim *et al.* 2006), e respondem melhor ao tratamento com laser (Kim *et al.* 2009).

No edema macular cistoide, observado em 30.3% a 55% dos olhos com EMD (Kang *et al.* 2004; Kim *et al.* 2006; Browning *et al.* 2007; Kim *et al.* 2009) (47% na série de Otani *et al.* (Otani *et al.* 1999)), observam-se áreas hiporrefletivas intrarretinianas, redondas ou ovais, que representam cavidades tipo quistos, separadas por septos hiperrefletivos, que se associam a desorganização estrutural das camadas adjacentes. No OCT, os espaços cistoides são visualizados nas camadas plexiforme externa/nuclear externa, mas também, na camada nuclear interna, estes últimos melhor diferenciados com os sistemas de OCT SD mais recentes (Otani & Kishi 2007; Baskin 2010; Byeon *et al.* 2012), observações que estão de acordo com estudos histológicos prévios em olhos com edema macular cistoide (Fine & Brucker 1981; Tso 1982; Yanoff *et al.* 1984). Os

espaços cistoides na camada nuclear interna têm um padrão angiográfico de acumulação de fluoresceína em “favo de mel”, enquanto o padrão angiográfico “petaloide” corresponde a espaços cistoides na camada plexiforme externa (Otani & Kishi 2007; Bolz, Ritter, *et al.* 2009; Murakami & Yoshimura 2013). Barthelmes *et al.* mostraram que a refletividade nestes espaços intrarretinianos associados à diabetes é maior que nos espaços que ocorrem na telangiectasia macular idiopática tipo 2 ou na distrofia de cones (Barthelmes, Sutter, *et al.* 2008). Correlacionou esta diferença com a natureza exsudativa do EMD (*versus* degenerativa na telangiectasia macular idiopática tipo 2), associação a rutura da BHR e consequente maior concentração proteica. Cerca de três décadas antes, Tso e Wolter consideraram que o edema macular cistoide é causado pela acumulação de fluido extracelular (Wolter 1981; Tso 1982). Em olhos com edema macular cistoide crónico, formam-se grandes cavidades cistoides, por fusão dos espaços cistoides das camadas externas e internas e desaparecimento dos septos, que podem envolver toda a camada da retina, com desorganização e atrofia adjacentes (Otani *et al.* 1999; Byeon *et al.* 2012). Alasil *et al.* observou que as alterações cistoides, a par da interrupção dos segmentos externos dos fotorreceptores, se associam a redução da AV (Alasil *et al.* 2010). A presença de formações cistoides foi também associada a diminuição da sensibilidade retiniana, independentemente do seu efeito sobre a espessura da retina ou rutura da linha de junção dos segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores (Yohannan *et al.* 2013). O tamanho dos espaços cistoides parece ser determinante no grau de AV dos doentes (Panozzo *et al.* 2004; Koleva-Georgieva & Sivkova 2008; Helmy & Atta Allah 2013).

O descolamento seroso da retina foi descrito em 6% a 15% dos casos de EMD (Otani *et al.* 1999; Kang *et al.* 2004; Kim *et al.* 2006; Browning *et al.* 2007), como uma acumulação de fluido no espaço subretiniano, hiporrefletiva, associada a elevação em cúpula da retina neurosensorial adjacente, hiperrefletiva (sem elevação do EPR). O descolamento seroso da retina normalmente não é detetado clinicamente ou na AF (Ozdemir *et al.* 2005), e a sua presença não parece correlacionar-se fortemente com a AV (Alasil *et al.* 2010; Kim *et al.* 2006; Murakami *et al.* 2011a). A etiopatogenia do descolamento seroso da retina não é completamente compreendida. Alguns autores

advogam a tração macular na sua génese (Kaiser *et al.* 2001), enquanto outros rejeitam esta hipótese (Catier *et al.* 2005). Alguns têm considerado que poderá estar relacionada com a disfunção da BHR externa (Gaucher *et al.* 2008), ou ter origem nas camadas externas da retina (Ota *et al.* 2010; Byeon *et al.* 2012). Alguns autores consideraram-na inócua e transitória (Ozdemir *et al.* 2005), enquanto para outros representa uma fase avançada de edema crónico (Brancato & Lumbroso 2004), com mau prognóstico após tratamento (Ota *et al.* 2010; Shimura *et al.* 2011).

As anomalias da interface vitreomacular incluíam a presença de membranas epirretinianas, tração vitreomacular ou ambas, e foram observadas em cerca de 15.6% dos doentes com EMD na série de Kim *et al.* (Kim *et al.* 2006). A membrana epirretiniana é observada no OCT como uma banda hiperrefletiva na superfície interna da retina, ou apresentar um tufo ou extremidade, hiperrefletivo, ou um pseudo-buraco (Wilkins *et al.* 1996); a tração vitreomacular é identificada pela presença de uma banda hiperrefletiva na superfície interna da retina, que se pode estender para o nervo ótico ou periféricamente. Ghazi *et al.* observaram alterações da interface vitreomacular no OCT em 52% a 67% dos olhos com EMD persistente após tratamento laser (Ghazi *et al.* 2007). De facto, quando existem anomalias da interface vitreomacular, alguns autores encontraram evidências de que a vitrectomia com descolamento da hialoideia posterior é mais indicada para a recuperação da AV (Massin *et al.* 2003; Lewis *et al.* 1992; Flaxel *et al.* 2010; Haller *et al.* 2010).

Na série de Kim *et al.* o descolamento tracional da retina ocorreu em 2.9%, visualizado como uma área hiporrefletiva inferior ao bordo hiperrefletivo da retina descolada, que normalmente adquire uma configuração em pico (Kim *et al.* 2006).

A estes padrões morfológicos associa-se nas imagens do OCT uma perda ou irregularidade do contorno da depressão foveal, aumento variável da espessura da retina e alteração da normal arquitetura intrarretiniana.

Os padrões morfológicos não são mutuamente exclusivos e podem ser observados em diversas combinações, associando-se a aumento da espessura da retina e

diminuição da AV, que variam com o padrão subjacente (Kang *et al.* 2004; Kim *et al.* 2006; Yamamoto *et al.* 2001; Alkuraya *et al.* 2005). Por exemplo, doentes com edema macular cistoide têm maior espessura, em média, do que doentes com aumento difuso da espessura; o descolamento tracional e o descolamento seroso da retina associam-se a grandes aumentos da espessura (Kim *et al.* 2006). Ao examinar a correlação entre os vários padrões tomográficos do EMD e a AV, Kim *et al.* encontraram associações significativas entre a perda de AV e a espessura da retina, o edema macular cistoide e a tração vitreomacular (Kim *et al.* 2006). Com efeito, a tração tangencial produzida pela interface vitreomacular tem sido associada ao desenvolvimento de EMD (Lewis *et al.* 1992; Harbour *et al.* 1996; Schepens *et al.* 1984). Alguns autores notaram que o padrão do OCT com edema macular cistoide (excluindo o descolamento tracional da retina) tem o efeito mais profundo sobre a AV (Kim *et al.* 2006; Alasil *et al.* 2010).

No entanto, mais recentemente, a introdução dos sistemas de OCT SD, com maior resolução, tem permitido uma visualização mais detalhada da interface vitreomacular, e das doenças relacionadas; a delimitação e individualização das camadas da retina neurosensorial e da retina externa (complexo fotorreceptores-EPR), e das alterações estruturais que lhe estão associadas, não aparentes com os sistemas TD.

Assim, em 2013, o grupo internacional de estudo da tração vitreomacular desenvolveu um sistema de classificação anatômica baseado no OCT para as doenças da interface vitreomacular: a adesão vitreomacular, a tração vitreomacular e o buraco macular (Duker *et al.* 2013). A adesão vitreomacular foi definida pelo descolamento parcial do vítreo perifoveal, com aderências vitreomaculares remanescentes, numa área num raio de 3 mm da fóvea, mas sem anomalias morfológicas da fóvea. É normalmente o resultado da idade, e pode levar a descolamento posterior do vítreo sem incidentes ou a condições patológicas. A adesão vitreomacular é adicionalmente classificada pelo tamanho da adesão, em focal, se  $\leq 1500 \mu\text{m}$  ou ampla, se  $> 1500 \mu\text{m}$ , e em isolada, na ausência de doença ocular, ou concorrente, se associada a degenerescência macular relacionada com a idade, oclusão venosa ou EMD, por exemplo. A tração vitreomacular foi caracterizada por um descolamento posterior do



vítreo parcial anômalo, com aderência persistente do córtex vítreo numa área num raio de 3 mm da fóvea na área macular, de que resulta tração e consequente alteração anatômica do contorno da fóvea, alterações estruturais intrarretinianas (que podem incluir: pseudoquistos, esquisis macular, edema macular cistoide, fluido subretiniano), elevação da fóvea do EPR, ou uma combinação destas alterações. A tração vitreomacular também é classificada pelo diâmetro da aderência do vítreo à superfície macular, em focal, se a aderência é  $\leq 1500 \mu\text{m}$ , ou ampla, se a aderência é  $> 1500 \mu\text{m}$ , e isolada ou concorrente. Com a progressão do descolamento posterior do vítreo, podem permanecer resíduos de vítreo na superfície da retina, cuja proliferação pode originar uma membrana epirretiniana. A contração da membrana epirretiniana amplifica a tração sobre a fóvea. O buraco macular de espessura total foi definido como um defeito anatômico na fóvea com interrupção de todas as camadas da retina neurosensorial, desde a membrana limitante interna até ao EPR. O buraco macular foi classificado pelo tamanho (“tamanho da abertura”), em pequeno ( $\leq 250 \mu\text{m}$ ), médio ( $> 250 - \leq 400 \mu\text{m}$ ), ou grande ( $> 400 \mu\text{m}$ ); pelo estado do vítreo, podendo estar associado à presença ou ausência de tração vitreomacular; e pela causa, em primário, se causado por tração vítrea por descolamento posterior do vítreo anômalo, ou secundário, se for o resultado direto de outras características patológicas para além da tração vitreomacular. O termo *impending macular hole* foi proposto para descrever casos em que se observa, num olho, buraco macular de toda a espessura e, no outro olho, tração vitreomacular. O buraco macular lamelar é um defeito parcial da espessura na fóvea, com integridade da camada de fotorreceptores; no pseudo-buraco macular observa-se uma membrana epirretiniana concomitante, com uma abertura central, mas sem perda de tecido da fóvea.

Tem sido argumentado que a avaliação clínica e a documentação na fotografia a cores do fundo ocular permitem visualizar as lesões características da RD, como por exemplo os exsudatos duros, MAs e hemorragias, de uma forma mais sensível e específica que o OCT. No entanto, por exemplo as manchas algodinosas, superficiais, traduzindo edema da camada de fibras nervosas, e as hemorragias, a diferentes

profundidades, podem ser observadas no OCT como lesões hiperrefletivas, com margens mal definidas.

Adicionalmente, usando a maior resolução dos sistemas de OCT SD, têm sido descritas várias alterações nas camadas intrarretinianas. A diminuição de espessura da camada de células ganglionares, traduzindo lesão destas células, foi documentada em olhos com maculopatia isquêmica, com e sem EMD (Byeon *et al.* 2009). Interessantemente, nas fases iniciais da RD, em olhos sem EMD, foram descritas pequenas lesões hiperrefletivas (“pontos”), em todas as camadas da retina, que os autores atribuíram à presença de agregados de células da microglia ativadas (Vujosevic & Midenia 2013). O OCT SD também mostrou os MAs como focos hiperrefletivos na camada nuclear interna, frequentemente associados a cavidades cistoides (Horii *et al.* 2010). Murakami *et al.* observaram, ainda, que em doentes com EMCS, olhos com edema macular cistoide apresentavam mais MAs na rede capilar perifoveal e, associadamente, alargamento da zona avascular da fóvea nas imagens de AF (Murakami *et al.* 2011b). Os exsudatos duros são observados como áreas hiperrefletivas nas camadas externas com cone de sombra posterior (Otani *et al.* 1999), em consonância com dados histopatológicas, que mostraram que os exsudatos duros precipitam maioritariamente na camada plexiforme externa (Murata *et al.* 1992). Trabalhos recentes com o OCT SD também têm mostrado que, para além da determinação da espessura macular, este sistema poderá mostrar focos hiperrefletivos em todas as camadas da retina, com predomínio nas camadas plexiforme externa/nuclear externa, que poderão representar precursores ou componentes dos exsudatos duros (lípidos extravasados) (Deák *et al.* 2010; Byeon *et al.* 2012). Em olhos com EMD tratados com fotocoagulação laser focal, os focos hiperrefletivos sofreram alterações dinâmicas ao longo de 4 meses de seguimento após o laser, e a diminuição do edema acompanhou a diminuição do número e concentração destes focos (Deák *et al.* 2010). Similarmente, Bolz *et al.* descreveram pequenos focos hiperrefletivos, com menos de 30 µm de diâmetro, em todas as camadas da retina e formando placas confluentes na camada plexiforme externa, que poderão, também, corresponder a proteínas ou lipoproteínas extravasadas, atuando como precursores dos exsudatos

duros (Bolz, Schmidt-Erfurth, *et al.* 2009). Com os sistemas de OCT SD foram, ainda, documentadas alterações anatómicas apenas 1 dia após a realização de tratamentos laser. As cicatrizes de laser foram observadas nas camadas externas da retina, incluindo a camada nuclear externa, fotorreceptores e EPR, associadas a uma diminuição da espessura da retina central, apesar de espessamento da retina à volta da lesão induzida pelo laser (Bolz *et al.* 2010). No EMD, a acumulação de focos hiperrefletivos no espaço subretiniano foi associada a mau prognóstico visual em olhos com descolamento seroso da retina (Ota *et al.* 2010) e sem descolamento seroso da retina (Uji *et al.* 2012), tal como observado vários anos antes no estudo ETDRS (Chew *et al.* 1996; Fong *et al.* 1997).

A maior resolução dos sistemas SD possibilita, pois, a visualização individual das camadas da retina neurosensorial, e em particular das camadas externas, o que tem permitido uma análise estrutural da retina e fotorreceptores mais detalhada do que previamente obtida com os sistemas TD. Nos últimos anos, a integridade da linha hiperrefletiva que representa a junção entre os segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores, no OCT, tem sido correlacionada com a função visual em diferentes patologias da retina, nomeadamente degenerescência macular relacionada com a idade (Hayashi *et al.* 2009), retinopatia pigmentar (Oishi *et al.* 2009; Sandberg *et al.* 2005), coroidopatia serosa central (Eandi *et al.* 2005), oclusão venosa de ramo (Murakami *et al.* 2007), telangiectasia macular idiopática tipo 2 (Paunescu *et al.* 2006; Maruko *et al.* 2008; Barthelmes, Gillies, *et al.* 2008), e também no EMD (Maheshwary *et al.* 2010; Alasil *et al.* 2010; Otani *et al.* 2010; Forooghian *et al.* 2010; Yanyali *et al.* 2011; Murakami, Nishijima, *et al.* 2012a; Shin *et al.* 2012). Num estudo em 30 olhos de 27 doentes com EMD, com o OCT Cirrus, Forooghian *et al.* sugeriram que o comprimento dos segmentos externos dos fotorreceptores se correlacionava mais estreitamente com a AV do que o valor da espessura macular (coeficientes de correlação: -0.61 a -0.81 *versus* 0.13 a 0.22) (Forooghian *et al.* 2010). A medição transversal da rutura/ausência da linha de junção dos segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores foi correlacionada com a AV (Maheshwary *et al.* 2010; Murakami, Nishijima, *et al.* 2012a) e, numa análise ponto-a-ponto, foi associada a

défices de sensibilidade retiniana, detetados na microperimetria (Yohannan *et al.* 2013).

A linha que representa a membrana limitante externa é outro marcador da integridade dos fotorreceptores, e a sua rutura também tem sido associada com a perda de AV no EMD (Murakami *et al.* 2011a; Murakami, Nishijima, *et al.* 2012a; Shin *et al.* 2012).

Outra vantagem do OCT sobre o exame clínico e a fotografia a cores do fundo ocular é a avaliação da interface vitreomacular (Ghazi *et al.* 2007), difícil de avaliar e detetar no exame clínico, e que pode ser visualizada no OCT, melhor com os recentes sistemas SD.

O OCT SD tem permitido, também, a imagiologia em profundidade, através da técnica EDI, *enhanced deep imaging*, com a qual se observou uma diminuição da espessura da coroideia em todas as fases da RD e em doentes com EMD, comparada com medições obtidas em populações controlo, que merecem clarificação adicional (Esmaelpour *et al.* 2011; Querques *et al.* 2012).

A identificação das alterações estruturais no OCT em doentes com EMD poderá ser útil não só para a seleção da terapêutica mais adequada, mas também, claramente, no seguimento dos doentes ao longo do tempo.

Em resumo, no EMD o OCT pode mostrar, de forma isolada ou mais frequentemente em associação, evidência de aumento da espessura da retina; perda do contorno da depressão foveal e irregularidade da arquitetura intrarretiniana; diminuição da refletividade ótica intrarretiniana; formações cistoides hiporrefletivas intrarretinianas; presença de fluido no espaço subretiniano (hiporrefletivo); doenças da interface vitreomacular.

#### 4.6.4.5. Relação entre Morfologia da Retina e AV no EMD

O EMD é reconhecido como uma importante causa de perda de AV nos doentes diabéticos (ETDRS 1985). A correlação entre a espessura da retina, medida pelo OCT, e a função visual no EMD constitui um tópico de interesse para clínicos e investigadores envolvidos em ensaios clínicos.

Estudos prévios têm mostrado uma grande variabilidade na força da correlação entre estes parâmetros, que pode variar entre 0.28 a 0.73 (Hee, Puliafito, *et al.* 1995; Goebel & Kretzchmar-Gross 2002; Massin *et al.* 2003; Nunes *et al.* 2010; Browning *et al.* 2007; Laursen *et al.* 2004; Martidis *et al.* 2002; Ozdemir *et al.* 2005).

O DRCR.net estudou o OCT de 251 olhos de 210 indivíduos com diabetes tipo 1 ou 2 e edema macular que afeta o centro da mácula, com indicação para tratamento com laser (Browning *et al.* 2007). Este grupo observou uma grande variedade de AV para um certo grau de espessura da retina, isto é, edema macular, embora constatasse uma maior percentagem de olhos com melhor AV no subgrupo com menor espessura da retina. Durante um período de seguimento de 12 meses, encontraram uma correlação moderada entre a AV e o valor de CPT, no OCT, que variou entre 0.36 e 0.52 (modesta), antes e após a realização de laser focal. Na análise de regressão, o CPT foi o fator identificado com maior poder preditivo de AV, na visita inicial e subsequentes, mas apenas explicava cerca de 27% da variação total de AV. Mais, na visita inicial, o impacto conjunto da espessura, e de outros fatores, como a idade, o derrame angiográfico de fluoresceína na área macular central e o nível de HbA1c, apenas contribuíram para 36% da variação da AV. Por outro lado, em cerca de 26% dos olhos foram observadas alterações paradoxais entre a AV e o valor de CPT (perda de AV com diminuição de CPT em 18% a 26% dos participantes durante o seguimento de 12 meses; ganho de AV com aumento de CPT, em 7% a 17% dos casos). Os resultados sugerem que outros fatores contribuem para a AV, nomeadamente a isquemia, duração do edema, fatores não esclarecidos neste estudo. Recentemente, os resultados dos estudos RISE e RIDE, após 36 meses de seguimento, em olhos com EMD tratados, nos primeiros 2 anos, com injeção intra-vítrea mensal de anti-VEGF *versus*

injeção simulada, e, no terceiro ano, administração intra-vítrea mensal a todos os doentes incluídos, sugeriram um benefício limitado no ganho de AV no grupo que inicialmente não recebeu tratamento intra-vítreo, que os autores atribuíram à cronicidade do edema e alguma perda irreversível de AV associada (Brown *et al.* 2013). As medições do OCT, embora uma ferramenta importante na avaliação clínica do doente, não são um indicador fidedigno da AV de cada doente, e portanto não substituem a sua determinação.

Alguns padrões morfológicos no OCT têm sido associados ao prognóstico visual após tratamento do EMD (Cheema *et al.* 2014).

Kim *et al.* analisaram retrospectivamente olhos com EMD que realizaram fotocoagulação com laser e observaram maior redução da espessura da retina, e melhor AV, em olhos com aumento difuso da espessura em relação a olhos com edema macular cistoide ou anomalias da interface vitreomacular (Kim *et al.* 2009), e, mais tarde, obtiveram resultados idênticos com anti-VEGF intra-vítreo (Kim *et al.* 2011). Soliman *et al.* correlacionaram a presença de quistos, em particular na camada nuclear interna, e de descolamento seroso da retina com pior prognóstico funcional após tratamento laser (Soliman *et al.* 2008); contrariamente Wu *et al.* observaram maior ganho de AV e redução da espessura nos olhos com edema macular cistoide, após anti-VEGF (Wu *et al.* 2012). Koytak *et al.* não encontraram diferenças significativas na AV entre diferentes padrões no OCT, após injeção única de anti-VEGF (Koytak *et al.* 2013). Roh *et al.* sugeriram que olhos com edema macular cistoide podem beneficiar mais de anti-VEGF intra-vítreo do que olhos com um padrão de edema no OCT mais difuso (Roh *et al.* 2010). Shan *et al.* observaram durante pelo menos 1 ano um grupo de 33 doentes com EMD, submetidos a vitrectomia (Shah *et al.* 2006). No pós-operatório observaram maior ganho de AV no grupo com tração vitreomacular detetada na visita inicial, clinicamente ou no OCT; doentes com fluido subretiniano, inicialmente, tiveram os piores resultados. Na série de Gaucher *et al.* a regressão do descolamento seroso da retina, após tratamento com laser ou triamcinolona intra-vítrea, ocorreu antes, durante ou após a absorção do edema

macular, o que fez supor que a sua absorção poderá ser independente da absorção do edema da retina (Gaucher *et al.* 2008).

#### 4.6.4.6. Classificação do EMD baseada no OCT

A informação obtida com o OCT complementa claramente a avaliação clínica e fotográfica do EMD. A informação que se pode retirar dos *scans* de OCT salienta as limitações da definição clínica de EMCS do ETDRS, o método tradicional para avaliar o EMCS, ao demonstrar que o EMD é mais do que um “aumento da espessura da retina”, mostrando claramente que se trata de uma entidade clínica complexa, com padrões morfológicos que devem ser precisamente avaliados e classificados, para decidir a opção terapêutica mais correta e compreender os seus potenciais benefícios. Nos últimos anos adquiriu, pois, uma importância crescente na avaliação inicial, estudo da história natural, decisão terapêutica e avaliação da sua eficácia, na prática clínica e na investigação. Critérios baseados no OCT são considerados em múltiplos ensaios clínicos para elegibilidade, decisão de tratamento e re-tratamento (Aiello, Beck, *et al.* 2011; Csaky *et al.* 2008) e avaliação de eficácia (Otani & Kishi 2000; Elman *et al.* 2010; Yoshikawa *et al.* 2013).

Para globalização de critérios entre médicos e comparação entre estudos é essencial uma classificação do EMD baseada no OCT uniforme, e não apenas clínica, com todas as limitações inerentes, amplamente reconhecidas.

Nesta classificação parece claro que devem constar dados qualitativos e quantitativos, que se podem extrair dos *scans* do OCT, como:

- Espessura da retina;
- Morfologia da retina;
- Topografia do edema na retina;
- Estado da interface vitreomacular: presença ou ausência de doenças.

### **Espessura da Retina**

- Ausência de edema macular – espessura da retina normal, inferior ao limiar de EMD subclínico (OCT Stratus TD: CPT < 225  $\mu\text{m}$ ; OCT Cirrus SD: CST < 240  $\mu\text{m}$ ; OCT Spectralis SD: CST < 250  $\mu\text{m}$ ) e morfologia intrarretiniana normal;

- EMD subclínico – OCT Stratus: CPT  $\geq$  225  $\mu\text{m}$  e  $\leq$  299  $\mu\text{m}$ ; OCT Cirrus: homens - CST  $\geq$  240  $\mu\text{m}$  e  $\leq$  305  $\mu\text{m}$ ; mulheres - CST  $\geq$  240  $\mu\text{m}$  e  $\leq$  290  $\mu\text{m}$ ; OCT Spectralis: homens - CST  $\geq$  250  $\mu\text{m}$  e  $\leq$  320  $\mu\text{m}$ ; mulheres - CST  $\geq$  250  $\mu\text{m}$  e  $\leq$  305  $\mu\text{m}$ ;

- Edema macular com envolvimento do centro – aumento da espessura da retina na área macular central (valor de CST) (OCT Stratus: CST  $\geq$  250  $\mu\text{m}$ ; OCT Cirrus: homens - CST  $\geq$  305  $\mu\text{m}$ ; mulheres - CST  $\geq$  290  $\mu\text{m}$ ; OCT Spectralis: homens - CST  $\geq$  320  $\mu\text{m}$ ; mulheres - CST  $\geq$  305  $\mu\text{m}$ ).

### **Morfologia da Retina**

- Aumento difuso da espessura da retina – aumento da espessura com diminuição de refletividade ótica intrarretiniana, irregularidade estrutural e atenuação/ausência da depressão foveal; mas ausência de espaços cistoides intrarretinianos;

- Edema macular cistoide – observação de espaços cistoides hiporrefletivos intrarretinianos, de diferentes dimensões, nas camadas internas ou externas. Classificado em ligeiro, quando se associa a espaços cistoides pequenos; moderado, espaços intermédios; grave, quando se observam formções cistoides grandes e confluentes;

- Descolamento seroso da retina – observação de descolamento macular seroso, observado pela presença de espaço hiporrefletivo subretiniano;



- Focos hiperrefletivos intrarretinianos ou no espaço subretiniano, traduzindo exsudatos lipídicos.

### **Topografia do EMD**

- Edema macular extrafoveal, que não envolve a área macular central no mapa de espessura da retina, isto é, a área central com 1000  $\mu\text{m}$  - quantificação de áreas afetadas pelo edema (até 8) e sua localização (anel interno ou externo);

- Edema macular que envolve a área macular central no mapa de espessura da retina, que se pode associar a edema nas outras áreas adjacentes.

### **Doenças da Interface Vitreomacular**

Classificadas de acordo com o sistema de classificação anatómica baseado no OCT, proposto recentemente pelo grupo internacional de estudo da tração vitreomacular (Duker *et al.* 2013).

- Ausência de adesão/tração macular – presença de descolamento posterior do vítreo completo (visualização de anel de Weiss), ou ausência de descolamento posterior do vítreo, não se visualizando a hialoideia posterior; ausência de membrana epirretiniana;

- Adesão vitreomacular – presença de descolamento parcial (anómalo) do vítreo perifoveal, com aderências vitreomaculares remanescentes, sem anomalias morfológicas da fóvea. Focal, se  $\leq 1500 \mu\text{m}$ , ou ampla se  $> 1500 \mu\text{m}$ ; isolada, sem doença ocular concomitante, ou concorrente, se associada a doença ocular;

- Tração vitreomacular - presença de descolamento posterior do vítreo parcial (anómalo), com aderência persistente na área macular (área num raio de 3 mm da fóvea), com alteração anatómica do contorno da fóvea, alterações estruturais intrarretinianas, elevação da fóvea do EPR, ou uma combinação destas alterações.

Focal, se aderência  $\leq 1500 \mu\text{m}$ , ou ampla se aderência  $> 1500 \mu\text{m}$ ; isolada ou concorrente. Pode existir membrana epirretiniana associada.

- Buraco macular – presença de defeito anatómico na fóvea com interrupção de todas as camadas da retina, desde a membrana limitante interna até ao EPR. Adicionalmente classificado pela causa, em primário, se associado a tração vítrea (descolamento posterior do vítreo anómalo), ou secundário, se resultar de outras características patológicas para além da tração vitreomacular; pelo tamanho, em pequeno, se  $\leq 250 \mu\text{m}$ , médio, se  $250 - 400 \mu\text{m}$ , ou grande, se  $> 400 \mu\text{m}$ ; e pela presença ou ausência de tração vitreomacular. *Impending macular hole* é classificado quando ocorre buraco macular de toda a espessura num olho e no outro olho tração vitreomacular; buraco macular lamelar corresponde a um defeito parcial da retina na fóvea, com integridade dos fotorreceptores; pseudo-buraco macular é classificado quando existe uma membrana epirretiniana com uma abertura central, mas sem perda de tecido da fóvea.

**Integridade da membrana limitante externa e da linha de junção dos segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores:**

- Membrana limitante externa e linha de junção dos segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores intactas, isto é, continuas;

- Rutura da membrana limitante externa e/ou da linha de junção dos segmentos internos e segmentos externos dos fotorreceptores – quantificação e localização, área macular central *versus* extrafoveal.

## Capítulo III



## 5. Artigos publicados

### CLINICAL SCIENCES

# Retinal Thickness in Eyes With Mild Nonproliferative Retinopathy in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus

## Comparison of Measurements Obtained by Retinal Thickness Analysis and Optical Coherence Tomography

Isabel Pires, MD; Rui C. Bernardes, MSc; Conceição L. Lobo, MD, PhD; Mário A. Soares, Tech; José G. Cunha-Vaz, MD, PhD

**Objective:** To compare measurements of retinal thickness in eyes with mild nonproliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus using 2 different techniques: the retinal thickness analyzer (RTA) and optical coherence tomography (OCT).

**Methods:** Twenty-eight eyes from 28 patients with type 2 diabetes mellitus and mild nonproliferative retinopathy were classified according to the Wisconsin grading system by 7-field stereoscopic fundus photography. Ten eyes were classified as level 10 (absence of visible lesions) and 18 as level 20 or 35 (minimal retinopathy). All eyes were examined by the RTA and OCT. Healthy populations were used to establish reference maps for the RTA (n=14; mean age, 48 years; age range, 42-55 years) and OCT (n=10; mean age, 56 years; age range, 43-68 years). Reference maps were computed using the

means  $\pm 2$  SDs of the values obtained for each location. Increases in thickness were computed as a percentage of increase over these reference maps.

**Results:** The RTA detected increases in thickness in 1 or more locations in 24 of the 28 diabetic eyes examined, whereas OCT detected increases in only 3 eyes. The percentages of increase detected by the RTA ranged from 0.3% to 73.5%, whereas OCT detected percentages of increase of 0.3% to 4.8%.

**Conclusion:** Optical coherence tomography is less sensitive than the RTA in detecting localized increases in retinal thickness in the initial stages of diabetic retinal disease.

*Arch Ophthalmol.* 2002;120:1301-1306

From the Department of Ophthalmology, University Hospital of Coimbra (Drs Pires, Lobo, and Cunha-Vaz and Ms Soares), the Center of New Technologies for Medicine (Mr Bernardes and Dr Cunha-Vaz), Association for Biomedical Research and Innovation on Light and Image (Dr Cunha-Vaz), and the Institute of Biomedical Research on Light and Image, Faculty of Medicine, University of Coimbra (Drs Lobo and Cunha-Vaz), Coimbra, Portugal.

**D**IABETIC RETINOPATHY (DR) remains a leading cause of blindness in developed countries. Macular edema is a frequent alteration in type 2 diabetes mellitus and the most frequent cause of visual loss.<sup>1</sup> It has been considered to be mainly due to abnormal fluid accumulation resulting from a breakdown of the blood-retinal barrier.<sup>2</sup>

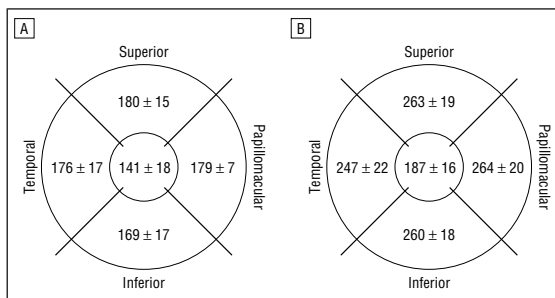
A definition of clinically significant macular edema (CSME) has been proposed by the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS).<sup>3</sup> Current diagnostic methods for its detection and evaluation are slitlamp biomicroscopy (SLB) and stereoscopic fundus photography (SFP), providing a subjective evaluation of retinal thickness.

Detection of retinal thickening by means of SLB or SFP, however, seems to be associated with relatively low sensitivity. A study by Shahidi et al<sup>4</sup> using the retinal thickness analyzer (RTA) shows that SLB

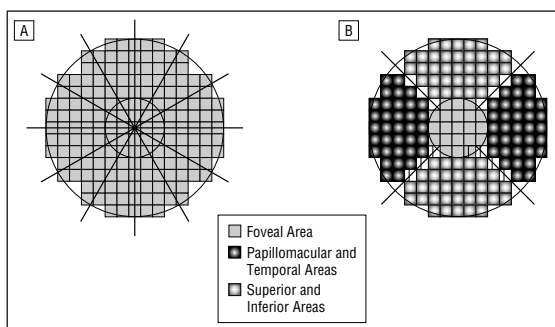
and SFP may detect increases in thickness only when they show values of more than 60% greater than the reference population and may, therefore, be unable to identify mild or localized macular thickening.

Improved detection of macular edema is expected to offer new perspectives for the follow-up and treatment of DR. The ETDRS, which is based on SLB and SFP findings, has demonstrated that photocoagulation for CSME only reduces the risk of moderate visual loss by approximately 50%.<sup>2</sup>

Optical imaging instruments, such as the RTA (Talia Technology Ltd, Mevasseret, Israel) and optical coherence tomography (OCT) (Zeiss Humphrey Systems, Dublin, Calif), have been proposed as powerful tools for the objective assessment of macular edema. It seems desirable to test these methods when minimal changes in retinal thickness may be present, when other methods cannot identify changes, and when visual acuity is not affected. Both techniques, which are capable of measuring retinal



**Figure 1.** Retinal thickness analyzer (A) and optical coherence tomography (B) reference maps from controls showing the mean ± SD thickness values for each of the 5 areas of interest. Values are given in micrometers for a right eye. The 5 locations—the fovea (1000 µm) and the papillomacular, superior, temporal, and inferior quadrants of the retina—were automatically measured and averaged.



**Figure 2.** A, Best fit between retinal thickness analyzer (RTA) and optical coherence tomography (OCT) measurements for the 5 locations of interest. Each square represents an area measuring 200 × 200 µm (RTA). Also shown are 2 concentric circles with 1000- and 3000-µm radii, establishing the limits used by OCT. B, Locations of general RTA measurements vs OCT measurement lines.

thickness and rapidly generating thickness maps at the posterior pole,<sup>5,6</sup> are noninvasive and noncontact procedures.

We used the RTA and OCT to measure retinal thickness in the eyes of healthy volunteers and diabetic patients with minimal nonproliferative DR to compare both methods.

## METHODS

### PATIENTS

Twenty-eight patients (10 men and 18 women), aged 50 to 69 years (mean ± SD age, 59.2 ± 5.4 years), with an established diagnosis of type 2 diabetes mellitus were recruited to participate in this study. Duration of diabetes mellitus ranged from 1 to 20 years (mean ± SD, 7.9 ± 4.8 years), and glycosylated hemoglobin values ranged from 5.5% to 11.7% (mean ± SD, 7.3% ± 1.5%). Blood pressure levels were 155/85 mm Hg or less.

All patients underwent a complete ophthalmologic examination, including the following assessments: corneal refractive power, refractive error and best-corrected visual acuity, intraocular pressure, SFP, and retinal thickness measurements obtained using both of the quantitative methods (the RTA and OCT). All eyes had a best-corrected visual acuity of 20/20, clear media, no neovascularization, and no CSME or previous laser treatment.

Fundus examination was performed by SLB using a +90-diopter (D) lens and a Goldmann contact lens and 7-field SFP obtained and classified by an independent grader (C.L.L.) ac-

ording to the criteria of the ETDRS protocol<sup>3</sup> without being aware of the RTA or OCT findings. Stereoscopic pairs of fields were obtained using a 30° fundus camera. Ten eyes were classified as level 10 (DR absent) and 18 as level 20 or 35 (microaneurysms only or mild nonproliferative DR, respectively). Only 1 eye of each patient was studied.

Retinal thickness was assessed after the clinical examination by using the RTA and OCT in a single session through a dilated pupil (minimum of 5-6 mm), with drops of 2.5% phenylephrine hydrochloride and 1% tropicamide, by an experienced examiner (M.A.S.) who was aware of the clinical findings. A single examination was performed using each method. Before the study, a full explanation of the procedure was given to all participants, and informed consent was obtained in all cases. Tenets of the Declaration of Helsinki were followed.

Two healthy populations volunteered to participate as age-matched control groups for the RTA (n=14; mean age, 48 years; age range, 42-55 years) and OCT (n=10; mean age, 56 years; age range, 43-68 years). All of the individuals in these 2 control groups underwent a complete ophthalmologic examination and had a best-corrected visual acuity of 20/20 OU (refraction was within 2 D of emmetropia), clear media, normal visual fields, and absence of optic disc or retinal abnormalities on fundus examination (performed by SLB using a Goldmann contact lens). Retinal thickness was measured in both eyes using the RTA and OCT by the same examiner through a dilated pupil. Only 1 eye from each volunteer was randomly selected to compute RTA and OCT reference maps, using the means + 2 SDs. The following mean ± SD results were obtained: for the RTA—central foveal thickness, 141 ± 18 µm; papillomacular area, 179 ± 7 µm; superior area, 180 ± 15 µm; temporal area, 176 ± 17 µm; and inferior area, 169 ± 17 µm; for OCT—central foveal thickness, 187 ± 16 µm; papillomacular area, 264 ± 20 µm; superior area, 263 ± 19 µm; temporal area, 247 ± 22 µm; and inferior area, 260 ± 18 µm (**Figure 1**).

### RETINAL THICKNESS ANALYZER

The RTA is a quantitative and reproducible method for evaluating retinal thickness.<sup>2,5,7-10</sup>

The principle of retinal thickness analysis is based on projecting a thin helium-neon laser (543-nm) slit obliquely on the retina and viewing it at an angle in a manner similar to SLB. The total area scanned with the RTA is 6000 × 6000 µm, with each pixel representing an area of 200 × 200 µm.

To compare RTA and OCT areas of thickness, a new thickness map for the RTA measurements was built. Considering the covered area for each single value of the RTA thickness map and the areas covered at the 5 different locations of the OCT map, a new thickness map of the RTA was computed. This map takes into account the values that best fit the locations covered by the OCT map (**Figure 2**). The software version used was the 2.11 with analysis 6.35 (Talia Technology Ltd).

### OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY

Optical coherence tomography is a diagnostic technique that provides cross-sectional tomographs of the retinal structure in vivo in which optical interferometry is used to resolve the distances of reflective structures within the eye. It is analogous to ultrasound B-scan but with superior resolution—approximately 10 µm in the retina.<sup>6,11-13</sup>

Data are displayed in 2 different manners: as a numeric report and as a false-color topographic map divided into 9 ETDRS-type regions. For each of these regions, an average retinal thickness is automatically computed. In the color-coded map, bright colors, such as red and white, correspond to optical reflectivity areas and dark colors, such as blue and black, indicate reflectivity areas.

Acquisition time is 1 second for each of the 6 radial lines needed for a complete topographic macular examination. Patient discomfort, however, is minimal.

The software version used was A6.2 (Zeiss Humphrey Systems).

#### LOCATIONS FOR RETINAL THICKNESS MEASUREMENTS

The OCT scans were performed in the control and diabetic eyes using the 6-radial-lines pattern, each 3.45 mm long, passing through the center of fixation. The scanning protocol for retinal mapping was first proposed by Hee et al.<sup>6</sup> Each of the 6 tomograms (B-scans) was oriented along a line intersecting the central fovea and containing 100 equally spaced axial profiles (A-scans) of optical reflectivity.

For this study, 5 measurements of retinal thickness were considered. These 5 values were automatically obtained in 5 retinal locations within a circle: a central disc area of 1 mm in diameter, centered on the patient's fixation, which was assumed to correspond to the central fovea, and in a peripheral ring area, 3 mm in diameter, in 4 retinal quadrants—papillo-macular, superior, temporal, and inferior (Figure 2).

The RTA scans were obtained from the same diabetic eyes by the same examiner (M.A.S.). Retinal thickness measurements made by the RTA, as previously stated, produce an output map in which each value covers an area of  $200 \times 200 \mu\text{m}$ . To compare the measurements made by the 2 instruments, a best-fit overlapping area of both measures was found (Figure 2). Figure 2 shows 2 concentric circles of 1000- and 3000- $\mu\text{m}$  radii. The shaded squares represent locations of RTA measurements to be considered for each of the 5 locations of the OCT measurements (Figure 2A) and the locations of general RTA measurements vs OCT line measurements (Figure 2B).

As a result, the central site of the OCT measures an area of  $0.79 \text{ mm}^2$ , and the RTA squares cover an area of  $0.84 \text{ mm}^2$ , which is the closest area possible, representing an increase of 6% in total area for this location. For the remaining locations (superior, inferior, papillomacular, and temporal), the process repeats, with the OCT covering an area of  $1.57 \text{ mm}^2$  and the RTA covering an area of  $1.40 \text{ mm}^2$  (12% more area covered by the OCT).

Although in the central area (1 mm in diameter) the information provided by each method can be assumed to be equally detailed in both methods, as we get away from the central fovea, the information provided by the RTA is more detailed than that given by OCT. Optical coherence tomography keeps its measurements along a line, not evaluating the thickness in the areas between the lines. As a result, 1.5 mm from the center of the fovea, that is, at the outer frontier of the 3-mm ring, the distances between OCT measurements (one line to the next) are larger than  $750 \mu\text{m}$ .

#### DATA ANALYSIS

Retinal thickness maps of the eyes from diabetic patients under study were obtained using the RTA and OCT. Moreover, maps of increased thickness were computed by comparing the thickness values of the eyes under study with both reference maps (means + 2 SDs) established for the RTA and OCT using a reference population. Reproducibility data for the RTA and OCT can be found elsewhere.<sup>8,9,11,13-15</sup>

#### RESULTS

The results are summarized in the **Table**. The RTA detected thickness increases in 24 of 28 patients, with values ranging from 0.3% to 73.5%. The RTA increased val-

ues were noted in at least 1 location in all level 10 patients, in 8 of 11 level 20 patients, and in 6 of 7 level 35 patients. Furthermore, increased thickness was detected in more than 1 location simultaneously in 18 patients, and 9 patients had increased thickness in all 5 locations examined. These 9 patients—3 graded as level 10 (patients 1, 3, and 7), 4 as level 20 (patients 11, 12, 15, and 19), and 2 as level 35 (patients 26 and 27)—seem to have a more diffuse type of macular thickening that may occur independently of the retinopathy photographic level. Four patients—3 graded as level 20 (patients 11, 15, and 19) and 1 as level 35 (patient 27)—had marked central foveal thickness (increases 20% higher than the reference values). No eye graded level 10 showed increases in retinal thickness higher than 20%. The Table shows that these large increases are accompanied by similar large increases in the 4 remaining areas.

Optical coherence tomography detected retinal thickness increases in 2 level 10 eyes (patients 3 and 7) and in 1 level 35 eye (patient 23) ranging from 0.3% to 4.8%, always located on the foveal area.

The RTA and OCT retinal thickness increases were the same in patients 3 and 7 in the central fovea. However, patient 19 showed a large increase in thickness as measured by the RTA in the foveal area (73.5%), whereas OCT detected no change. On the other hand, OCT detected an increase in central foveal thickness of 0.8% in patient 23, but the RTA did not show any increase.

Patients in this study showed acceptable glycosylated hemoglobin levels, with a mean value of 7.3%, indicating a general situation of relatively good metabolic control, with duration of diabetes mellitus ranging from 1 to 20 years (mean, 7.9 years). No direct correlation could be established between increases in retinal thickness and duration of disease or short-term status of metabolic control.

#### COMMENT

Results of the present study show that localized areas of retinal edema, that is, areas of abnormal increase in retinal thickness, are occurring in the macula in the early stages of diabetic retinal disease. Localized areas of increased retinal thickness were identified by the RTA in 24 of the 28 eyes examined but by OCT in only 3 of the 28 eyes.

All 10 eyes with no visible retinopathy showed localized areas of abnormal increase with the RTA. Although the increases were minimal in 4 eyes, they were greater than the values of a reference population (means + 2 SDs). Optical coherence tomography detected increases in retinal thickness in only 2 of these eyes.

Of 18 eyes with mild nonproliferative retinopathy of level 20 or 35 using the Wisconsin grading, based on SFP, 14 showed localized areas of increased retinal thickness when using the RTA, whereas only 1 showed increased retinal thickness in the fovea using OCT. In this study, the RTA detects abnormal increases in retinal thickness in the diabetic retina before OCT. The results obtained using the RTA demonstrate that localized retinal edema is one of the earliest alterations occurring in the

**Retinal Thickness Increases Detected by OCT and the RTA in Patients With Diabetic Retinopathy\***

Patient No./Age, y/ Duration of DM, y	Glycosylated Hemoglobin, %	Eye	Wisconsin Grading Level	Retinal Thickness Increase, %									
				Foveal Area		Papillomacular Area		Superior Area		Temporal Area		Inferior Area	
				OCT	RTA	OCT	RTA	OCT	RTA	OCT	RTA	OCT	RTA
1/57/20	6.7	L	10	0.0	1.8	0.0	17.7	0.0	12.1	0.0	0.4	0.0	6.0
2/53/5	5.7	L	10	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3/67/16	7.7	R	10	0.3	4.0	0.0	21.4	0.0	15.0	0.0	1.2	0.0	4.3
4/58/4	11.7	R	10	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5/63/6	6.3	R	10	0.0	0.0	0.0	6.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6/61/3	7.6	L	10	0.0	0.0	0.0	29.4	0.0	20.6	0.0	8.1	0.0	7.4
7/67/8	7.2	R	10	4.8	11.8	0.0	26.1	0.0	25.3	0.0	17.0	0.0	14.9
8/50/12	6.3	L	10	0.0	19.2	0.0	37.0	0.0	12.4	0.0	0.0	0.0	0.0
9/57/10	7.5	R	10	0.0	0.0	0.0	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10/55/5	9.5	L	10	0.0	10.9	0.0	28.4	0.0	7.4	0.0	0.0	0.0	0.5
11/56/7	5.7	R	20	0.0	22.8	0.0	40.7	0.0	24.1	0.0	25.7	0.0	19.8
12/58/8	8.1	L	20	0.0	6.5	0.0	16.8	0.0	8.2	0.0	3.3	0.0	6.9
13/54/15	6.7	R	20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
14/54/5	7.5	L	20	0.0	3.1	0.0	13.4	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0
15/53/8	6.8	L	20	0.0	23.1	0.0	40.0	0.0	22.9	0.0	19.1	0.0	24.6
16/66/4	6.3	L	20	0.0	15.9	0.0	3.0	0.0	5.8	0.0	3.0	0.0	0.0
17/54/15	7.8	R	20	0.0	0.0	0.0	15.3	0.0	11.8	0.0	15.3	0.0	1.9
18/65/8	6.2	R	20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
19/61/2	9.4	L	20	0.0	73.5	0.0	55.8	0.0	36.8	0.0	31.1	0.0	43.1
20/63/1	5.6	R	20	0.0	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21/69/4	6.1	R	20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22/63/4	6.2	R	35	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	8.6	0.0	0.0	0.0	0.0
23/66/6	7.3	R	35	0.8	0.0	0.0	11.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24/65/15	8.5	L	35	0.0	0.0	0.0	6.8	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
25/55/7	9.5	R	35	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
26/56/10	6.7	L	35	0.0	7.2	0.0	33.1	0.0	19.0	0.0	9.4	0.0	13.5
27/52/10	9.3	R	35	0.0	56.5	0.0	47.4	0.0	31.9	0.0	24.8	0.0	38.4
28/59/3	5.5	R	35	0.0	8.4	0.0	22.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

\*OCT indicates optical coherence tomography; RTA, retinal thickness analyzer; DM, diabetes mellitus; L, left; and R, right.

macula in eyes with type 2 diabetes mellitus. In this study, however, OCT did not show these areas of localized retinal edema. Hee et al,<sup>6</sup> using OCT for screening for macular edema, showed similar results. They detected increased foveal thickness in only 2 of 55 eyes from 31 patients who had no visible retinopathy.

The localized areas of retinal edema detected in the fovea by the RTA showed increases in retinal thickness that varied from 0.3% to 73.5% higher than the reference values for the respective area under evaluation. The highest increase in eyes with Wisconsin grading level 10 was 19.2%, whereas larger increases reaching 56.5% and 73.5% were detected in eyes graded as level 20 or 35. Although our results indicate that increases in retinal thickness are an early finding in diabetic retinas, they also show that more marked increases in retinal thickness are associated with progression of the retinal microvascular alterations. It is also shown in this study that the development of localized areas of retinal edema is not a constant finding, as 4 of 28 eyes remained edema free. No clear correlation was found in this study among duration of disease, level of metabolic control, and the presence of localized areas of retinal edema.

Evidence from previous studies by Lobo et al,<sup>16,17</sup> using integrated data obtained with the retinal leakage

analyzer and the RTA, indicates that 2 types of retinal edema may occur simultaneously in the earliest stages of diabetic retinal disease: retinal edema of the cytotoxic type, occurring independently of an associated breakdown of the blood-retinal barrier, and a vasogenic type of edema directly due to alteration of the blood-retinal barrier.

In a subsequent 1-year follow-up study<sup>17</sup> of eyes with minimal nonproliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus, retinal edema was shown to be predominantly of the vasogenic type, that is, due to an alteration of the blood-retinal barrier. In that same study, the extent and height of the retinal edema did not correlate with the levels of metabolic control.

The reference values and SDs obtained by the RTA and OCT in the present study were similar to those reported in the literature. The central macular thickness in a similarly aged group examined by the RTA and OCT showed mean  $\pm$  SD values of  $141 \pm 18 \mu\text{m}$  and  $187 \pm 16 \mu\text{m}$ , respectively. None of the eyes included in this study had the characteristics of CSME, as described in the ETDRS, and all the diabetic patients had 20/20 visual acuity.

The absolute values of macular thickness quantified by the RTA and OCT are still uncertain because



comparison between the in vivo retinal thickness measurements and histologic analysis has not been conducted owing to the associated problems. In vitro retinal thickness measurements reported in the literature<sup>18,19</sup> establish a range of 100 to 130  $\mu\text{m}$  for the central foveal thickness.

Several authors have published different measures for foveal thickness using the RTA. Zeimer<sup>8</sup> stated a reference retinal thickness of 167  $\mu\text{m}$  in the fovea, with mean local variation of 23  $\mu\text{m}$ . Landau et al<sup>9</sup> make reference to 178  $\mu\text{m}$ . These authors used a previous software version in which the thickness was considered the distance between the sites of maximal steepness of the slit profile. Currently, the thickness is considered the distance between the peaks of 2 lorentzian curves fitted to the slit profile.<sup>2</sup> Particular attention should be given to this fact when comparing different reference values, as not all authors make reference to the software versions used or the area covered in the "foveal area." Konno et al<sup>10</sup> used only the minimum value in field 5 of the thickness map and found a mean  $\pm$  SD retinal thickness of  $107 \pm 18.6 \mu\text{m}$  using software version 2.13 with analysis version 6.30. Neubauer et al,<sup>14</sup> using RTA software version 3 with analysis version 7.06, found a mean  $\pm$  SD value of  $181 \pm 17 \mu\text{m}$ . They also found a median of 150  $\mu\text{m}$ , which means that there is equal probability of finding higher and lower values from this mark.

For OCT, Hee et al<sup>6</sup> found a mean  $\pm$  SD retinal thickness of  $174 \pm 18 \mu\text{m}$  for the central 500  $\mu\text{m}$ . Konno et al<sup>10</sup> found a mean  $\pm$  SD value of  $155 \pm 15 \mu\text{m}$  using software version A4.01 and looking for ". . . the minimum value located near the center of the image." Massin et al<sup>15</sup> found a mean  $\pm$  SD value for a central area 1 mm in diameter centered on the fovea of  $178 \pm 17 \mu\text{m}$  using software version A5, which differs 9  $\mu\text{m}$  from our results. Finally, Neubauer et al<sup>14</sup> found a mean  $\pm$  SD value of  $153 \pm 16 \mu\text{m}$  using software version A4.1. Again, they found a median value of 150  $\mu\text{m}$ , the same median as they found for the RTA.

We established both reference populations in our site. If there is any difference in age-matched populations for the RTA and OCT, it would mean a disadvantage for the RTA because the RTA population is younger. Zeimer<sup>8</sup> states that there is a decrease of 5% per year in macular thickness.

Shahidi and associates,<sup>4</sup> using the RTA, reported that clinical examination with SLB permits detection of retinal thickness only when it is more than 60% greater than reference retinal thickness measurements. This is in agreement with our findings. In our study, involving patients who did not have CSME when examined by SLB and SPF disclosed values in this borderline range in the central foveal area in only 2 of the 28 eyes.

There are obvious differences in the technique producing the measurements and the thickness maps between the RTA and OCT. Whereas in the central foveal area the information provided by each method can be assumed to be equally detailed, as we get away from the central fovea, the information provided by the RTA is clearly more detailed than that given by OCT. Optical coherence tomography makes its measurements along lines, not evaluating the thick-

ness in the areas between the lines. This is shown in Figure 2.

In our clinical experience with these methods, another advantage of the RTA is its short acquisition time. The 200 milliseconds required for the scanning procedure are associated with less discomfort to the patient because of less prolonged light exposures. Also, with the RTA, it is easier for patients to maintain steady ocular fixation, and there are fewer problems associated with blinking. On the other hand, in more advanced stages of retinopathy, RTA results may be affected by irregular reflections from hard exudates accumulated in the retina and by the interference of media opacities such as severe cataract or vitreous opacities.

Comparing the 2 techniques to measure retinal thickness, the RTA seems to be particularly appropriate for measuring changes in retinal thickness when these changes are minimal, particularly in the initial stages of diabetic retinal disease and in eyes without media opacities and in the absence of morphologic retinal alterations, such as hard exudates. We consider the RTA to be a promising tool to evaluate quantitatively the changes in retinal thickness before the development of CSME, when an early therapeutic intervention may be more effective. In our experience, OCT is particularly informative when there are changes in the retinal architecture through the formation of cysts or localized fluid detachments. None of these situations were found in the eyes included in this study. Studies in progress performed by our group examining the presence of macular edema after cataract surgery indicate that OCT detects only abnormal retinal thickness values where there is some degree of visible fluid accumulation and cystlike formations are found in OCT cross sections.

In conclusion, localized areas of increased retinal thickness (ie, edema) occur in the retina in type 2 diabetes mellitus in the initial stages of retinopathy. These areas of localized retinal edema may be identified and quantified by the RTA, offering a unique opportunity to study the effects of early intervention in the evolution of diabetic retinal edema to prevent its progression to CSME.

Submitted for publication December 11, 2001; final revision received June 25, 2002; accepted July 1, 2002.

Corresponding author and reprints: José G. Cunha-Vaz, MD, PhD, Department of Ophthalmology, University Hospital of Coimbra, Praceta Mota Pinto, 3000 Coimbra, Portugal (e-mail: cunhavaz@aibili.pt).

## REFERENCES

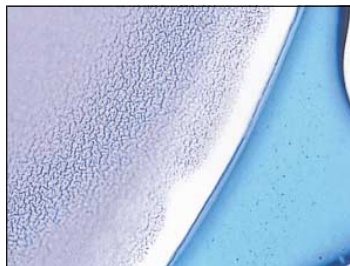
1. Aiello L, Gardner T, King G, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1998;21:143-156.
2. Smith R, Lee C, Charles H, Farber M, Cunha-Vaz J. Quantification of diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol*. 1987;105:218-222.
3. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation for diabetic macular edema: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. *Arch Ophthalmol*. 1985;103:1796-1806.
4. Shahidi M, Ogura Y, Blair N, Rusin M, Zeimer R. Retinal thickness analysis for quantitative assessment of diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol*. 1991;109:1115-1119.

5. Asrani S, Zeimer R, Goldberg M, Zou S. Application of rapid scanning retinal thickness analysis in retinal diseases. *Ophthalmology*. 1997;104:1145-1151.
6. Hee M, Puliafito C, Duker J, et al. Topography of diabetic macular edema with optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 1998;105:360-370.
7. Zeimer R, Shahidi M, Mori M, Zou S, Asrani S. A new method for rapid mapping of the retinal thickness at the posterior pole. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:1994-2001.
8. Zeimer R. Application of the retinal thickness analyzer to the diagnosis and management of ocular diseases. *Ophthalmol Clin North Am*. 1998;11:359-379.
9. Landau D, Schneidman E, Jacobovitz T, Rozenman Y. Quantitative in vivo retinal thickness measurements in healthy subjects. *Ophthalmology*. 1997;104:639-642.
10. Konno S, Akiba J, Yoshida A. Retinal thickness measurements with optical coherence tomography and the scanning retinal thickness analyzer. *Retina*. 2001;21:57-61.
11. Pedut-Kloizman T, Pakter H, Schuman J, Schwartz J, Hee M. Ophthalmic diagnosis using optical coherence tomography. *Ophthalmol Clin North Am*. 1998;11:465-486.
12. Hee M, Izatt J, Swanson E, et al. Optical coherence tomography of the human retina. *Arch Ophthalmol*. 1995;113:325-332.
13. Koozekanani D, Roberts C, Katz S, Herderick E. Intersession repeatability of macular thickness measurements with the Humphrey 2000 OCT. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1486-1491.
14. Neubauer A, Priglinger S, Ullrich S, et al. Comparison of foveal thickness measured with the retinal thickness analyzer and optical coherence tomography. *Retina*. 2001;21:596-601.
15. Massin P, Vicaud E, Haouchine B, Erginay A, Paques M, Gaudric A. Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:1135-1142.
16. Lobo C, Bernardes R, Cunha-Vaz J. Alterations of the blood-retinal barrier and retinal thickness in preclinical retinopathy in subjects with type 2 diabetes. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:1364-1369.
17. Lobo C, Bernardes R, Faria de Abreu J, Cunha-Vaz J. One-year follow-up of blood-retinal barrier and retinal thickness alterations in patients with type 2 diabetes mellitus and mild nonproliferative retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:1469-1474.
18. Straatsma B, Foos R, Spencer L. The retina: topography and clinical correlations. In: *Symposium on Retina and Retinal Surgery: Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology*. St Louis, Mo: Mosby-Year Book Inc; 1969: 1-26.
19. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddel JE. *Histology of the Human Eye: An Atlas and Textbook*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1971:490-492.

**ARCHIVES Web Quiz Winner**

**C**ongratulations to the winner of our February quiz, Luigi Capasso, MD, Il Università degli Studi di Napoli, Naples, Italy. The correct answer to our February challenge was calcium deposition. For a complete discussion of this case, see the Clinicopathologic Reports, Case Reports, and Small Case Series section in the March ARCHIVES (Pandey SK, Werner L, Apple DJ, Gravel J-P. Calcium precipitation on the optical surface of a foldable intraocular lens: a clinicopathological correlations. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:391-393).

Be sure to visit the *Archives of Ophthalmology* World Wide Web site (<http://www.archophthalmol.com>) and try your hand at our Clinical Challenge Interactive Quiz. We invite visitors to make a diagnosis based on selected information from a case report or other feature scheduled to be published in the following month's print edition of the ARCHIVES. The first visitor to e-mail our Web editors with the correct answer will be recognized in the print journal and on our Web site and will also receive a free copy of the book *One Hundred Years of JAMA Landmark Articles*.



**Figure 2.** Photomicrograph of the explanted opacified Hydroview intraocular lens (Bausch & Lomb, Rochester, NY) showing the confluent deposits on the anterior optical surface. The polymethyl-methacrylate haptics are free of any deposits (original magnification  $\times 100$ ).

# Macular Thickness Measured by Stratus Optical Coherence Tomography in Patients with Diabetes Type 2 and Mild Nonproliferative Retinopathy without Clinical Evidence of Macular Edema

Isabel Pires<sup>a,c</sup> Ana Rita Santos<sup>a</sup> Sandrina Nunes<sup>a,c</sup> Conceição Lobo<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Association for Innovation and Biomedical Research on Light and Image, <sup>b</sup>Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, and <sup>c</sup>IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

## Key Words

Retinal thickness · Optical coherence tomography · Macular edema · Diabetes type 2 · Diabetic retinopathy

## Abstract

To evaluate macular thickness in eyes with mild nonproliferative diabetic retinopathy (NPDR), patients with diabetes type 2, NPDR level 20 or 35, and without evidence of clinical macular edema underwent best-corrected visual acuity assessment, color fundus photography and Stratus optical coherence tomography. Mean center point thickness (CPT) and mean central subfield (CSF) thickness were compared with those of a healthy control population. 410 eyes/patients aged  $61.2 \pm 8.3$  years, and with glycosylated hemoglobin of  $7.9 \pm 1.5\%$  were included. Mean CPT and CSF were  $186.6 \pm 28.4$  and  $215.2 \pm 25$   $\mu\text{m}$ , respectively, significantly increased compared to healthy subjects ( $p < 0.001$ ). CSF thickness was abnormally increased in 17.6% of the patients, with values within the normal range in 79.5%, and abnormally decreased in 2.9%. CPT and CSF thickness were significantly thicker in men. No systemic factors showed a significant association. A significant increase in the macular thickness was found in eyes/patients with mild NPDR with-

out clinical macular edema; however, only 17.6% of the eyes/patients had abnormally increased values and less than 3% abnormally decreased values.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Macular thickness assessment is essential to evaluate and manage patients with diabetic retinopathy (DR), as diabetic macular edema is the major cause of severe visual impairment in this population [1, 2]. Slitlamp biomicroscopy of the fundus has been the standard method used for the clinical detection of diabetic macular edema [3], a process highly dependent on observer skill and experience, relatively insensitive to small degrees of foveal thickening [4–11]. Over the last few years, optical coherence tomography (OCT) imaging gained popularity, as it provides objective and reproducible measurements of retinal thickness (RT) [6, 12–14] and allows visualization of intraretinal morphology, similar to histological sections [15].

In the literature, reports on macular thickness measurements obtained with OCT in the early disease stages have been contradictory. In diabetes type 2, a decrease in central

KARGER

© 2013 S. Karger AG, Basel  
0030-3755/13/2294-0181\$38.00/0

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/oph

Isabel Pires  
Association for Innovation and Biomedical Research on Light and Image  
Azinhaga de Santa Comba, Celas  
PT-3000-548 Coimbra (Portugal)

subfield (CSF) thickness was found by Oshitari et al. [16], in patients without DR, and by Asefzadeh et al. [17], in a subgroup of patients without DR or with mild DR. These findings were attributed to a neurodegenerative process in the diabetic retina, preceding vascular abnormalities [16, 17]. Other studies including patients with both types of diabetes, and absence of DR or mild DR lesions, showed no differences in RT measurements between diabetics and nondiabetics [18–20]. Finally, thicker central maculas in subjects with mild nonproliferative diabetic retinopathy (NPDR) were reported in studies including both types of diabetic patients, suggesting the occurrence of subclinical macular edema in the initial stages of DR [6, 8, 9].

The effect of age and gender on RT mean values has also been analyzed. Few studies found no significant correlation between RT and aging, in normal [7, 21] and in diabetic subjects [6–8], whereas most studies have documented higher RT measurements in healthy men [19, 21–23] and in diabetic males with mild NPDR [7, 20, 24].

To address these issues, we used time domain Stratus OCT to measure RT in a large cohort of diabetic subjects ( $n = 410$ ) with mild NPDR (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study, ETDRS, levels 20 and 35), and compared the results with those obtained from a healthy control population. Stratus OCT was used because it was the most widely available equipment when the study was initiated and to allow comparison with previous reports in the literature. The effect of age and gender, duration of diabetes, glycosylated hemoglobin, blood pressure and serum lipid levels on macular thickness measurements was analyzed.

## Materials and Methods

This study was conducted at the Association for Innovation and Biomedical Research on Light and Image (AIBILI), Coimbra, Portugal, and it reports the baseline values of a prospective study, designed to evaluate the 2-year progression of eyes with mild NPDR to clinically significant macular edema in diabetes type 2. Informed consent was obtained from each patient after explanation of the nature of the study and before any study procedure. The study followed the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the local institutional review board and the local ethics committee (trial registry NCT00763802, ClinicalTrials.gov).

### Study Population

Patients with adult-onset diagnosed type 2 diabetes, aged between 40 and 80 years, and no history of renal, liver or pancreatic disease in the medical records, were prospectively recruited. Eyes were eligible if they met the following inclusion criteria: (1) absence of foveal thickening on funduscopy; (2) mild NPDR – ETDRS levels 20 and 35, graded on color fundus photography

by the AIBILI Reading Center; (3) best-corrected visual acuity (BCVA)  $\geq 20/25$  ( $\geq 79$  letters), assessed with ETDRS charts; (4) refraction with spherical equivalent less than 5 dpt.

Patients with cataract or other eye disease that may interfere with fundus examination or any study procedure, glaucoma, vitreous syneresis or posterior vitreous detachment, other retinal vascular disease, recent intraocular surgery, previous laser therapy or any other previous treatment modality for macular edema were excluded from participation in the study.

### Study Procedures

#### Clinical and Ophthalmological Examination

Demographic data, including age (age at the time of examination) and gender, duration of diabetes and current treatment, and concomitant medications were recorded. Biochemical analysis of blood samples was performed on the day of the clinical examination for glycosylated hemoglobin, total cholesterol, high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol and triglycerides. Systolic and diastolic blood pressures were evaluated after the participants had been seated for 5 min with legs uncrossed. A total of 3 measurements were taken and averaged.

All patients underwent ophthalmological examination with determination of BCVA, by certified technicians, using ETDRS procedures and standardized refraction, slitlamp biomicroscopy, Goldmann applanation tonometry and ophthalmoscopy. Color fundus photographs of the 7 standard fields were obtained and graded for the presence and severity of DR, at the AIBILI Reading Center, using the ETDRS protocol, a modification of the Arlie House classification scheme [25].

Only one eye per subject was enrolled; when both eyes of the same patient were eligible, the right or left eye was randomly chosen.

#### OCT Measurements

The eyes from each subject were imaged using Stratus OCT (Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, Calif., USA), version 4 system, after pupil dilation, with tropicamide 1% and phenylephrine hydrochloride 2.5%, by a certified and experienced technician. RT was measured employing the standard fast macular thickness protocol of the Stratus OCT. This protocol generates retinal images in 1.92 s from 6 cross-sectional scan lines, 6 mm in length, in a radial spoke pattern centered on the fovea, at equally spaced angular orientations ( $30^\circ$ ). Each image had a resolution of 10  $\mu\text{m}$ , axially, and 20  $\mu\text{m}$ , transversally. The software places segmentation lines at the vitreoretinal interface and the junction between the inner and outer segments of the photoreceptors. The location of these boundaries is automatically determined by a thresholding algorithm that detects changes in reflectivity at each of these interfaces. RT is the distance measured between the two boundaries. Each line scan consists of 128 A scans; therefore, RT is measured at 768 points along 6 intersecting lines. This feature decreases the total acquisition time but sacrifices resolution. Scan analysis was performed using the Stratus OCT hardware with the Zeiss commercial scan analysis software. The machine printout comprises automated RT measurements in several macular locations, including the central point (center point thickness, CPT), the mean thickness at the point of intersection of the 6 radial scans, CSF, central circle area with 1-mm diameter, and in 4 inner and 4 outer subfields, located in 2 concentric rings, 1–3 mm (inner ring) and 3–6 mm (outer ring), from the center of the fovea, respectively.

**Table 1.** Age-matched healthy control group (n = 28)

	Mean	SD	Reference value (mean - 2 SD, mean + 2 SD)
Mean CPT, $\mu\text{m}$	171.3	20.0	130–210
Mean CSF thickness, $\mu\text{m}$	201.1	18.9	160–240

SD = Standard deviation.

Macular scans were visually inspected at AIBILI Reading Center for centration and image quality. Scans with signal strength  $<5$  were excluded from the study. No manual measurements or corrections were done.

#### OCT Normative Database

An age-matched healthy control group, composed by 28 normal eyes from 28 nondiabetic healthy volunteers, 11 men (39.3%) and 17 women (60.7%), with a mean age ( $\pm$ SD) of  $53.4 \pm 8.7$  years (range: 40–77) was included. Control subjects had BCVA of 20/20, refraction with spherical equivalent of less than 3 dpt, unremarkable slitlamp biomicroscopy findings, normal intraocular pressure and absence of macular/retinal lesions or optic nerve abnormalities on funduscopy. These eyes were imaged using the same OCT device used in diabetic subjects, the Stratus OCT (Carl Zeiss Meditec), version 4 system, using the same acquisition protocol.

Mean ( $\pm$ SD) CPT and CSF thickness were  $171.3 \pm 20$  and  $201.1 \pm 18.9 \mu\text{m}$ , respectively (table 1). No statistically significant differences were found between genders (males: mean CPT and CSF thickness  $\pm$  SD were  $172.0 \pm 18.0$  and  $201.8 \pm 15.4 \mu\text{m}$ , and females: mean CPT and CSF thickness  $\pm$  SD were  $171.6 \pm 25.0$  and  $201.4 \pm 21.8 \mu\text{m}$ ,  $p > 0.05$ ). Reference values were within 130–210  $\mu\text{m}$  for CPT, and 160–240  $\mu\text{m}$  for CSF thickness (i.e. mean - 2 SD and mean + 2 SD).

Due to the relatively small number of healthy controls, reference values were compared with those in the Stratus OCT normative database, obtained by Carl Zeiss Meditec from 350 healthy subjects, aged from 20 to 80 years. In this database, reference values are within 135–210  $\mu\text{m}$  for CPT, and 160–240  $\mu\text{m}$  for CSF thickness. In their normative database no statistically significant differences were found between gender and ethnicities [26, 27].

No statistically significant differences were found between the age-matched healthy control group included in this study (n = 28) and the Carl Zeiss Meditec normative database (CPT,  $p = 0.309$ , and CSF,  $p = 0.507$ ). Therefore, because the RT measurements obtained in our age-matched healthy control population are comparable to those reported in the Carl Zeiss Meditec normative database, we used it for comparison with the diabetic patient population.

#### Statistical Methods

Statistically significant differences between genders were tested using the Mann-Whitney test and correlations between CPT, CSF thicknesses and BCVA were assessed using the Pearson correlation coefficient.

To identify predictive factors for the RT parameters (CPT and CSF), a linear regression analysis was performed considering age, gender, and systemic parameters as predictive factors.

Statistical analyses were performed using the STATA software version 12.1, and p values lower than 0.05 were considered as statistically significant results.

## Results

Four hundred and ten eyes from 410 subjects with diabetes type 2 and mild NPDR were enrolled in this study. The study group was composed by 259 (63.2%) men and 151 (36.8%) women, with a mean  $\pm$  SD age of  $61.2 \pm 8.3$  years (range: 40–78). Diabetes duration was on average  $10.0 \pm 5.0$  years (range: 1–21). Two hundred and ninety-three (71.5%) subjects were using diabetic oral agents, and 117 (28.5%) were taking insulin (61 insulin alone and 56 insulin combined with oral agents). The mean ( $\pm$ SD) level of glycosylated hemoglobin was  $7.9 \pm 1.5\%$  (range: 5.0–13.0). Averaged blood pressure (systolic and diastolic), serum total, high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels are shown in table 2. The BCVA letter score (and approximate Snellen equivalent) was  $85.6 \pm 4.1$  letters (20/25; range: 80–95). Table 2 shows demographic and systemic parameters of the study population. Men had a significantly better BCVA and higher diastolic blood pressure, while women had significantly higher levels of cholesterol and high-density lipoprotein.

Overall, mean ( $\pm$ SD) CPT and CSF thickness were  $186.6 \pm 28.4$  and  $215.2 \pm 25 \mu\text{m}$ , respectively. On average, diabetic subjects had a significant thickness increase in the central point ( $p < 0.001$ ) and the CSF ( $p < 0.001$ ), as compared with the control population. Nevertheless, using the normal reference values for the CPT (135–215), the numbers (and percentages) of eyes within, below and above these limits were 338 (82.4%), 9 (2.2%) and 63 (15.4%), respectively. For the CSF (normal reference values: 168–239), these numbers were 326 (79.5%), 12 (2.9%) and 72 (17.6%).

In our diabetic population, retinas from men were significantly thicker than retinas from women, in the central point (men:  $190 \pm 26.6 \mu\text{m}$ ; women:  $180.8 \pm 30.4 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ ) and in the CSF (men:  $219.2 \pm 23.2 \mu\text{m}$ ; women:  $208.4 \pm 26.6 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ ). Table 3 shows the ophthalmological characterization of the whole group considering genders for BCVA and OCT measurements.

CPT and CSF measurements showed a very strong correlation ( $r = 0.934$ ;  $p < 0.001$ ). No correlations were found between BCVA and RT, for the CPT  $r = -0.015$  ( $p = 0.672$ ) and for the CSF  $r = 0.029$  ( $p = 0.408$ ).

Based on the regression analysis, gender and age were the only parameters that showed an association with the central RT. Male gender was associated with higher RT

**Table 2.** Diabetic study population: demographic and systemic parameters (n = 410)

Variable		Mean	SD	Median	IQR
Age, years		61.2	8.3	62	55–67
	♂/♀	60.8/61.8	8.3/8.3	62/63	55–67/56–68
Diabetes duration, years		10	5	10	6–14
	♂/♀	9.9/10.2	5.0/5.1	10/10	6–14/6–14
HbA <sub>1c</sub> , %		7.9	1.5	7.7	6.9–8.9
	♂/♀	7.8/8.1	1.5/1.6	7.6/7.9	6.7–8.9/7–8.9
SBP, mm Hg		151.7	21.5	151	136–164
	♂/♀	152.5/150.5	21.3/21.8	152/150	137–165/135–164
DBP, mm Hg		75.9	10.6	76	69–82
	♂/♀	76.9/74.3*	10.2/11.2	76.5/75	70–83/66–81
Cholesterol, mg/dl		197.5	42	194	168–222
	♂/♀	193.9/203.5*	44.1/37.5	190.5/201	162–223/177–222
HDL, mg/dl		51.1	12.8	49	42–58
	♂/♀	48.3/55.8*	11.6/13.6	47/52	40–55/47–62
LDL, mg/dl		128.1	32.6	125	105–148
	♂/♀	127/130.1	34.2/29.8	123/126	102–152/111–141
Triglycerides, mg/dl		175.1	115.9	145	104–214
	♂/♀	181.5/164.1	126.5/94.4	152.5/139	106–216/101–212

SD = Standard deviation; IQR = interquartile range; ♂ = men; ♀ = women; HbA<sub>1c</sub> = glycosylated hemoglobin A<sub>1c</sub>; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure; HDL = high-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein. \* p < 0.05: statistically significant difference between genders.

**Table 3.** Ophthalmological characterization of the study population (BCVA and OCT) (n = 410)

Variable		Mean	SD	Median	IQR
BCVA, letters		85.6	4.1	85	85–90
	♂/♀	86.1/84.6*	4/4	85/85	85–90/80–90
CPT, μm		186.6	28.4	185	166–204
	♂/♀	190/180.8*	26.6/30.4	189/176	168–208/160–197
CSF thickness, μm		215.2	25	215.5	198–233
	♂/♀	219.2/208.4*	23.2/26.6	220/204	205–235/191–227

SD = standard deviation; IQR = interquartile range; ♂ = men; ♀ = women. \* p < 0.05: statistically significant difference between genders.

measurements, both in the central point (p = 0.002) and in the CSF (p < 0.001). Age showed a positive association with CPT (p = 0.034; in the CSF, p = 0.291). After adjusting for gender, no systemic factors were significantly associated with RT in the central macula.

### Discussion

In this study we performed macular thickness measurements in a large group of 410 patients with mild NPDR (ETDRS levels 20 and 35) and diabetes type 2. Only

eyes with no evidence of macular edema on slitlamp examination or previous treatment for macular edema were included in the study (1 eye per patient, the study eye).

In this population of patients with diabetes type 2, mean macular CPT was 186.6 ± 28.4 μm, and mean macular CSF thickness was 215.2 ± 25.0 μm, both significantly increased over nondiabetic controls. It is generally recognized that CPT measurements show a greater variability than CSF thickness measurements and are, therefore, less reliable [14, 28].

Our CSF values are in agreement with measurements previously reported by Oshitari et al. [16] (220.1 ± 33.6 μm)

and Asefzadeh et al. [17] ( $218.0 \pm 29.0 \mu\text{m}$ ), in similar populations, with mild NPDR and diabetes type 2. Other studies, which included subjects with both types of diabetes and eyes without retinal vascular changes or with mild NPDR, reported lower thickness measurements in the CSF [18, 20, 24], similar to values found in healthy, non-diabetic controls.

Diabetic men showed, in our population, significantly thicker maculas than diabetic women. This gender imbalance has, indeed, been reported previously both in normal, healthy subjects [19, 21, 29] and diabetic patients with mild NPDR [16, 20, 24].

In addition to duration of disease, other risk factors for development and progression of diabetic maculopathy have included higher glycosylated hemoglobin levels [30, 31], higher blood pressure levels [32, 33] and higher serum lipid levels [34–36]. We found no significant association between any of these systemic parameters and macular thickness measurements, in our population, as in other reports [17, 20].

The presence of increased macular thickness measurements in the absence of clinical evidence of macular edema on slitlamp examination is not surprising, considering previously published reports. Brown et al. [4] found a poor agreement in macular thickness assessments between slitlamp examination and OCT imaging when macular thickness values remain below  $300 \mu\text{m}$ . Thus, the term subclinical macular edema was introduced to describe diabetic subjects without a diagnosis of edema, on slitlamp examination, but showing abnormally increased macular thickness in OCT [4, 24]. More recently, the DRCR.net defined subclinical macular edema as absence of signs of edema, on slitlamp examination, and a CPT measurement on Stratus OCT greater than  $225 \mu\text{m}$  and less than  $299 \mu\text{m}$  [37]. Using this definition, we detected in our group of patients 38 (9%) eyes/patients that meet the criteria of subclinical macular edema.

A review of the literature shows variable results of RT measured by OCT in eyes with mild NPDR. Reports of abnormal retinal thinning have been associated with the presence of a neurodegenerative disease process preceding retinal vascular disease [16, 17].

Increased RT in diabetes, in the initial stages of clinical DR, has been associated with the presence of an early alteration of the inner blood-retina barrier and resultant fluid accumulation in the retina [38]. There have also been reports of retinal ganglion cell death and axonal degeneration occurring in the initial stages of DR, particularly in diabetes type 1 patients [39, 40].

Comparing our population of 410 patients with diabetes type 2 and mild NPDR, considering only 1 eye per patient, with our CSF thickness reference values and Carl Zeiss Meditec normative database, we found that retinal thinning was present in only 2.9% of the diabetic eyes, 79.5% had RT values within the normal range and 17.6% had abnormally increased values, showing definite retinal thickening. It is possible that both disease processes, neuronal degeneration and breakdown of the inner blood-retina barrier, occur in variable degrees in different patients in the initial stages of DR. Neuronal degeneration causing retinal thinning could be masked by increased fluid accumulation, resulting in different RT values in different patients. A more sophisticated analysis of the different inner retinal layers of the retina using spectral domain OCT, as performed by van Dijk et al. [41], will certainly contribute to answer this question.

Future studies should also consider separately diabetes type 1 and diabetes type 2 patients. Finally, more information on subclinical macular edema is clearly needed, particularly regarding its predictive value for the development of clinically significant macular edema.

## Acknowledgements

Financial support was granted by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal, under the research project PTDC/SAU-OSM/72635/2006 (trial registry NCT00763802, ClinicalTrials.gov).

## Disclosure Statement

Isabel Pires, Ana Rita Santos, Sandrina Nunes and Conceição Lobo work at AIBILI and have no other conflict of interest to declare.

## References

- 1 Klein R, Klein BE, Moss SE, Linton KL: The Beaver Dam Eye Study. Retinopathy in adults with newly discovered and previously diagnosed diabetes mellitus. *Ophthalmology* 1992; 99:58–62.
- 2 Aiello LP, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL III, Klein R: Diabetic retinopathy. Technical Review. *Diabetes Care* 1998;21:143–156.
- 3 Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Arch Ophthalmol* 1985;103:1796–1806.
- 4 Brown JC, Solomon SD, Bressler SB, Schachat AP, DiBernardo C, Bressler NM: Detection of diabetic foveal edema: contact lens biomicroscopy compared with optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 2004;122:330–335.

- 5 Sadda SR, Tan O, Walsh AC, Schuman JS, Varma R, Huang D: Automated detection of clinically significant macular edema by grid scanning optical coherence tomography. *Ophthalmology* 2006;113:1187.
- 6 Hee MR, Puliafito CA, Duker JS, Reichel E, Coker JG, Wilkins JR, Schuman JS, Swanson EA, Fujimoto JG: Topography of diabetic macular edema with optical coherence tomography. *Ophthalmology* 1998;105:360-370.
- 7 Massin P, Erginay A, Haouchine B, Mehdi AB, Paques M, Gaudric A: Retinal thickness in healthy and diabetic subjects measured using optical coherence tomography mapping software. *Eur J Ophthalmol* 2002;12:102-108.
- 8 Sánchez-Tocino H, Alvarez-Vidal A, Maldonado MJ, Moreno-Montañés J, García-Layana A: Retinal thickness study with optical coherence tomography in patients with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1588-1594.
- 9 Lattanzio R, Brancato R, Pierro L, Bandello F, Iaccher B, Fiore T, Maestranzi G: Macular thickness measured by optical coherence tomography (OCT) in diabetic patients. *Eur J Ophthalmol* 2002;12:482-487.
- 10 Yang CS, Cheng CY, Lee FL, Hsu WM, Liu JH: Quantitative assessment of retinal thickness in diabetic patients with and without clinically significant macular edema using optical coherence tomography. *Acta Ophthalmol Scand* 2001;79:266-270.
- 11 Browning DJ, McOwen MD, Bowen RM Jr, O'Marah TL: Comparison of the clinical diagnosis of diabetic macular edema with diagnosis by optical coherence tomography. *Ophthalmology* 2004;111:712-715.
- 12 Paunescu LA, Schuman JS, Price LL, Stark PC, Beaton S, Ishikawa H, Wollstein G, Fujimoto JG: Reproducibility of nerve fiber thickness, macular thickness, and optic nerve head measurements using Stratus OCT. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1716-1724.
- 13 Massin P, Vicaute E, Haouchine B, et al: Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1135-1142.
- 14 Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, Krzystolik MG, Strauber SF, Aiello LP, Beck RW, Berger BB, Bressler NM, Browning DJ, Chambers RB, Danis RP, Davis MD, Glassman AR, Gonzalez VH, Greenberg PB, Gross JG, Kim JE, Kollman C: Reproducibility of macular thickness and volume using Zeiss optical coherence tomography in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2007;114:1520-1525.
- 15 Puliafito CA, Hee MR, Lin CP, Reichel E, Schuman JS, Duker JS, Izatt JA, Swanson EA, Fujimoto JG: Imaging of macular diseases with optical coherence tomography. *Ophthalmology* 1995;102:217-229.
- 16 Oshitari T, Hanawa K, Adachi-Usami E: Changes of macular and RNFL thicknesses measured by Stratus OCT in patients with early stage diabetes. *Eye (Lond)* 2009;23:884-889.
- 17 Asefzadeh B, Fisch BM, Parenteau CE, Cavallerano AA: Macular thickness and systemic markers for diabetes in individuals with no or mild diabetic retinopathy. *Clin Experiment Ophthalmol* 2008;36:455-463.
- 18 Bressler NM, Edwards AR, Antoszyk AN, Beck RW, Browning DJ, Ciardella AP, Danis RP, Elman MJ, Friedman SM, Glassman AR, Gross JG, Li HK, Murtha TJ, Stone TW, Sun JK, Diabetic Retinopathy Clinical Research Network: Retinal thickness on Stratus optical coherence tomography in people with diabetes and minimal or no diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2008;145:894-901.
- 19 Kashani AH, Zimmer-Galler IE, Shah SM, Dustin L, Do DV, Elliott D, Haller JA, Nguyen QD: Retinal thickness analysis by race, gender, and age using Stratus OCT. *Am J Ophthalmol* 2010;149:496-502.
- 20 Sng CC, Cheung CY, Man RE, Wong W, Lavanya R, Mitchell P, Aung T, Wong TY: Influence of diabetes on macular thickness measured using optical coherence tomography: the Singapore Indian Eye Study. *Eye (Lond)* 2012;26:690-698.
- 21 Wong AC, Chan CW, Hui SP: Relationship of gender, body mass index, and axial length with central retinal thickness using optical coherence tomography. *Eye (Lond)* 2005;19:292-297.
- 22 Duan XR, Liang YB, Friedman DS, Sun LP, Wong TY, Tao QS, Bao L, Wang NL, Wang JJ: Normal macular thickness measurements using optical coherence tomography in healthy eyes of adult Chinese persons: the Handan Eye Study. *Ophthalmology* 2010;117:1585-1594.
- 23 Huang J, Liu X, Wu Z, Xiao H, Dustin L, Sadda S: Macular thickness measurements in normal eyes with time-domain and Fourier-domain optical coherence tomography. *Retina* 2009;29:980-987.
- 24 Browning DJ, Fraser CM, Clark S: The relationship of macular thickness to clinically graded diabetic retinopathy severity in eyes without clinically detected diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2008;115:533-539.
- 25 Early Treatment Diabetic Retinopathy Study design and baseline patient characteristics. ETDRS report number 7. *Ophthalmology* 1991;98(suppl 5):741-756.
- 26 Patella VM: Stratus OCT: establishment of normative reference values for retinal nerve fiber layer thickness. Carl Zeiss Meditec Web site. [http://www.zeiss.com/C1256C4F002-FF302/EmbedTitelIntern/StratusOCT/\\$File/OCT%20Normative%20Database%20Paper.pdf](http://www.zeiss.com/C1256C4F002-FF302/EmbedTitelIntern/StratusOCT/$File/OCT%20Normative%20Database%20Paper.pdf) (accessed February 28, 2013).
- 27 Stratus OCT™ Reference Manual. Carl Zeiss Meditec Web site. [http://www.meditec.zeiss.com/88256DE3007B916B/0/55B63359D850E15D882575E7000AA4AE/\\$file/stratus-oct5\\_en.pdf](http://www.meditec.zeiss.com/88256DE3007B916B/0/55B63359D850E15D882575E7000AA4AE/$file/stratus-oct5_en.pdf) (accessed February 28, 2013).
- 28 Grover S, Murthy RK, Brar VS, Chalam KV: Comparison of retinal thickness in normal eyes using Stratus and Spectralis optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:2644-2647.
- 29 Chan A, Duker JS, Ko TH, Fujimoto JG, Schuman JS: Normal macular thickness measurements in healthy eyes using Stratus optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 2006;124:193-198.
- 30 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-853.
- 31 Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ: Relationship of hyperglycemia to the long-term incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Intern Med* 1994;154:2169-2178.
- 32 Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, Holman RR, Kohner EM, UK Prospective Diabetes Study Group: Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch Ophthalmol* 2004;122:1631-1640.
- 33 Kohner EM, Aldington SJ, Stratton IM, Manley SE, Holman RR, Matthews DR, Turner RC: United Kingdom Prospective Diabetes Study. 30. Diabetic retinopathy at diagnosis of non-insulin-dependent diabetes mellitus and associated risk factors. *Arch Ophthalmol* 1998;116:297-303.
- 34 Benarous R, Sasongko MB, Qureshi S, Fenwick E, Dirani M, Wong TY, Lamoureux EL: Differential association of serum lipids with diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7464-7469.
- 35 Klein BE, Moss SE, Klein R, Surawicz TS: Serum cholesterol in Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 1992;15:282-287.
- 36 Klein BE, Moss SE, Klein R, Surawicz TS: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate. *Ophthalmology* 1991;98:1261-1265.
- 37 Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, Bressler NM, Miller KM, Beck RW, Bressler SB, Glassman AR, Kitchens JW, Meelia M, Schlossman DK: Observational study of subclinical diabetic macular edema. *Eye (Lond)* 2012;26:833-840.
- 38 Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C: Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol* 2011;21(suppl 6):S3-S9.
- 39 Bialosterski C, van Velthoven ME, Michels RP, Schlingemann RO, De Vries JH, Verbraak FD: Decreased optical coherence tomography-measured pericentral retinal thickness in patients with diabetes mellitus type 1 with minimal diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1135-1138.
- 40 Van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PH, Garvin MK, Sonka M, Lee K, De Vries JH, Michels RP, van Velthoven ME, Schlingemann RO, Abramoff MD: Decreased retinal ganglion cell layer thickness in patients with type 1 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:3660-3665.
- 41 Van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PH, Stehouwer M, Garvin MK, Sonka M, De Vries JH, Schlingemann RO, Abramoff MD: Early neurodegeneration in the retina of type 2 diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:2715-2719.



# Subclinical Macular Edema as a Predictor of Progression to Clinically Significant Macular Edema in Type 2 Diabetes

Isabel Pires<sup>a-c</sup> Ana Rita Santos<sup>a</sup> Sandrina Nunes<sup>a,c</sup> Conceição Lobo<sup>a-c</sup>  
José Cunha-Vaz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Association for Innovation and Biomedical Research on Light and Image, <sup>b</sup>Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, and <sup>c</sup>Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

## Key Words

Subclinical diabetic macular edema · Center point thickness · Optical coherence tomography · Clinically significant macular edema · Nonproliferative diabetic retinopathy · Type 2 diabetes

## Abstract

**Objective:** To examine the relationship between subclinical diabetic macular edema (DME) and the development of clinically significant macular edema (CSME) in nonproliferative diabetic retinopathy (NPDR) in patients with type 2 diabetes.

**Methods:** A prospective, monocenter, observational study was designed to follow patients/eyes with type 2 diabetes and NPDR (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study levels 20 and 35) with no prior laser treatment for 2 years or until development of CSME. Ophthalmologic examinations, including best-corrected visual acuity, fundus photography and optical coherence tomography (OCT), were performed at baseline, 6 months and a final visit. **Results:** A total of 348 patients completed study follow-up; 26 eyes developed CSME. Six out of 32 eyes/patients presenting subclinical DME at baseline developed CSME (18.7%), while 20 out of 316

eyes without subclinical DME developed CSME (6.3%). Eyes/patients with subclinical DME presented a risk for DME progression 3.686 times higher than that of eyes/patients without subclinical DME (95% confidence interval 1.221–7.988). **Conclusions:** Subclinical DME in eyes with NPDR identified by center point thickness measured on a Stratus OCT is a good predictor of CSME development. © 2013 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Optical coherence tomography (OCT) allows objective and quantitative evaluation of diabetic macular edema (DME), providing cross-sectional images of the internal microstructures of the retina and reproducible retinal thickness measurements [1, 2].

OCT has improved investigators' ability to follow macular edema changes, allowing detection of increased retinal thickness, i.e. edema, even before clinical detection by slit-lamp examination [3]. The term subclinical DME has been proposed to describe these early stages of macular edema [4–6]. Nevertheless, there are few data in

KARGER

© 2013 S. Karger AG, Basel  
0030-3755/13/0000-0000\$38.00/0

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/oph

Isabel Alexandra de Sousa Pires  
AIBILI – Azinhaga de Santa Comba, Celas  
PT-3000-548 Coimbra (Portugal)  
E-Mail isabel.maravilha@sapo.pt

the literature regarding the natural history of eyes with subclinical DME. Browning and Fraser [7] found progression to clinically significant macular edema (CSME) in 48 of 153 eyes with subclinical DME over a median follow-up period of 14 months. More recently, the Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (DRCR.net) [5] showed that one quarter to one half of eyes with subclinical DME would progress to CSME within 2 years after its identification.

We designed a prospective study to follow patients with type 2 diabetes and mild nonproliferative diabetic retinopathy (NPDR) lesions, during 2 years, with repeated clinical and OCT examinations. Eyes with subclinical DME at baseline were identified, and the rate of progression to CSME was investigated. We also analyzed the systemic and ocular features that may be associated with progression to CSME. The definition of subclinical DME proposed by the DRCR.net [5], consisting in an absence of edema involving the center of the fovea on slit-lamp examination and a center point thickness (CPT) measurement on Stratus OCT (Carl Zeiss Meditec, Dublin, Calif., USA) of  $\geq 225$  and  $\leq 299$   $\mu\text{m}$ , was used.

## Materials and Methods

This was a prospective, monocenter, observational study conducted at the Association for Innovation and Biomedical Research on Light and Image (AIBILI), Coimbra, Portugal, between September 2007 and December 2011. The study was designed to follow eyes in subjects with type 2 diabetes and NPDR, without prior treatment for DME, for 2 years or until development of CSME for which treatment is indicated. CSME was identified on clinical examination by retinal thickening within 500  $\mu\text{m}$  of the center of the fovea, or by the presence of hard exudates within 500  $\mu\text{m}$  of the center of the fovea associated with adjacent thickening of the retina, or thickening of at least 1 disc area, any part of which is within 1 disc diameter of the center of the fovea [8].

Written informed consent was obtained from each patient after explanation of the nature of the study and before any study procedure. Patients received no fee for their participation in the study. The study followed the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the local institutional review board and the local ethics committee (trial registry NCT00763802, ClinicalTrials.gov).

Subjects with adult-onset type 2 diabetes aged between 40 and 80 years were eligible if they had a best-corrected visual acuity (BCVA) letter score  $\geq 79$  (approximate Snellen equivalent of 20/25 or better) and refraction with spherical equivalent less than 5 diopters; absence of foveal thickening on stereoscopic fundus examination, and mild NPDR [Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) levels 20 and 35], graded on clinical examination and confirmed by the reading center on color fundus photography (CFP). Patients were excluded from participation in the study if they had any of the following: cataract or other eye disease that may interfere with fundus examination or any study pro-

cedure; glaucoma; vitreous syneresis or posterior vitreous detachment; other retinal vascular disease; recent intraocular surgery; previous laser therapy, or any other previous treatment modality for macular edema. Only one eye per subject was enrolled; when both eyes of the same patient were eligible, the right or left eye was randomly chosen.

Eyes of patients who fulfilled the inclusion criteria were screened for subclinical DME, defined as an absence of foveal edema on slit-lamp examination and a Stratus OCT-based CPT between 225 and 299  $\mu\text{m}$ , according to the definition of the DRCR.net [5].

Study patients were followed for up to 2 years, with examinations performed at baseline and after 6 and 24 months (3 visits in total), or until development of CSME for which treatment was indicated, at the discretion of the investigator. When CSME was detected before the 24-month visit and treatment was performed, for analysis purposes, the final study visit was the visit at the time of treatment.

During the study, ophthalmological examinations included, in all visits, determination of BCVA with ETDRS charts by certified technicians, using standardized refraction procedures, Goldmann applanation tonometry, and slit-lamp examination before and after pupil dilation, to assess foveal thickening. CFP of the 7 standard ETDRS fields was obtained at 30°, with a Zeiss FF450 camera (Carl Zeiss Meditec), and graded for the presence and severity of diabetic retinopathy (DR) at the Coimbra Ophthalmology Reading Center at AIBILI, using the ETDRS protocol, a modification of the Arlie House classification scheme [9]. CFP was performed at baseline, to determine study eligibility, and at the final visit, to evaluate progression of DR severity.

At the 3 visits, a certified and experienced technician performed macular thickness scans with a Stratus OCT (Carl Zeiss Meditec) version 4 system. Retinal thickness was measured using the fast macular thickness protocol of the Stratus OCT, which acquires 6 consecutive macular scans, 6 mm in length, centered on the fovea, at equally spaced angular orientations (30°), in 1.92 s of scanning. Retinal thickness measurements were based on the map analysis printout. This map displays mean ( $\pm$ SD) retinal thickness in several macular regions, including at the central point, central subfield (central area with 1-mm diameter) and in 4 sectors at 2 concentric rings, the inner and the outer ring, 1–3 and 3–6 mm from the center of the fovea, respectively. CPT is the mean thickness at the point of intersection of the 6 radial scans, i.e. mean thickness at the very center point of the fovea.

Macular scans were visually inspected at the Coimbra Ophthalmology Reading Center at AIBILI for centration and image quality and to ensure that the foveal depression was evident in the center of the scan. Additionally, scans were reviewed by a retina specialist for abnormalities, such as vitreoretinal traction, retinoschisis and lamellar macular holes. Scans with artifacts (boundary errors, decentration) and/or signal strength  $< 5$  were excluded from the study. No manual measurements or corrections were made.

At baseline, the patient's body weight, height and concomitant medications were recorded. On the day of the clinical examinations, patients also underwent biochemical analysis of blood samples for glycosylated hemoglobin ( $\text{HbA}_{1c}$ ), total cholesterol, high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels and evaluation of systolic and diastolic blood pressure (BP), with a digital automatic BP monitor. Three mea-

**Table 1.** Baseline demographic, systemic and ophthalmological characteristics of the study participants (n = 410)

Variable	Min.	Max.	Mean	SD	Median	IQR
Age, years	40	78	61.2	8.3	62.0	55–67
Diabetes duration, years	1	21	10.0	5.0	10.0	6–14
HbA <sub>1c</sub> , %	5	13	7.9	1.5	7.7	6.9–8.9
SBP, mg/dl	96	217	151.7	21.5	151	136–164
DBP, mg/dl	39	106	75.9	10.6	76	69–82
Glucose, mg/dl	38	468	176.9	751	165	119–226
Cholesterol, mg/dl	99	382	197.4	42.0	194	168–222
HDL cholesterol, mg/dl	24	104	51.1	12.8	49	42–58
LDL cholesterol, mg/dl	59	280	128.1	32.6	125	105–148
Triglycerides, mg/dl	49	1,126	175.1	115.9	145	104–214
BCVA, ETDRS letters	80	95	85.6	4.1	85	85–90
OCT-based CPT, $\mu$ m	112	280	186.6	28.4	185	166–204

At baseline, 38 patients (9.3%) had subclinical DME. Min. = Minimum; Max. = maximum; IQR = interquartile range; SBP = systolic BP; DBP = diastolic BP; HDL = high-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein.

Measurements were taken and averaged after the participants were seated for 5 min with legs uncrossed.

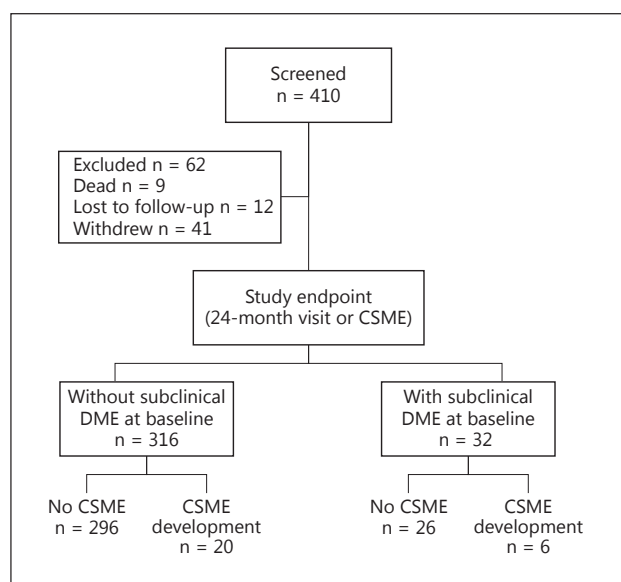
To identify predictive factors for the development of CSME, a logistic regression analysis was performed.

Statistically significant differences between groups were compared using the Mann-Whitney test, and statistically significant differences between visits were tested using the Wilcoxon test.

Statistical analyses were performed using STATA software (version 12.1). Statistically significant results were considered for p values  $\leq 0.05$ .

## Results

Four hundred and ten eyes from 410 subjects with type 2 diabetes and mild NPDR (ETDRS levels 20 and 35) were included in this prospective study and screened for subclinical DME between September 2007 and December 2009. The study group was composed of 259 men (63.2%) and 151 women (36.8%), with a mean  $\pm$  SD age of  $61.2 \pm 8.3$  years (range 40–78). Mean  $\pm$  SD diabetes duration and mean  $\pm$  SD HbA<sub>1c</sub> level were, respectively,  $10.0 \pm 5.0$  years (range 1–21) and  $7.9 \pm 1.5\%$  (range 5.0–13.0). Averaged BP (systolic and diastolic) and serum lipid levels are shown in table 1. The mean  $\pm$  SD BCVA letter score was  $85.6 \pm 4.1$  letters (range 80–95; approximate Snellen equivalent 20/20). At baseline, 38 eyes (9.3%) met the definition of subclinical DME chosen for this study, consisting in an absence of foveal thickening on slit-lamp examination and a Stratus OCT-based CPT between 225 and 299  $\mu$ m. Table 1 shows baseline demographic, systemic and ophthalmological characteristics of the study participants.



**Fig. 1.** CONSORT flowchart for eyes/patients enrolled in the study.

Overall, 376 patients attended the 6-month visit, and 348 completed study follow-up; 331 attended the 24-month visit (CSME detected in 6 eyes) and 17 reached the primary study outcome before the end of the study, i.e. developed CSME and received treatment. In total, 62 patients were lost to follow-up (fig. 1).

During follow-up, 15 eyes, 2 with subclinical DME at baseline, progressed on the ETDRS DR severity scale

from level 35 (mild NPDR) to level 43 (moderate NPDR). In this group of eyes, no significant differences in BCVA letter score were found between baseline and the final study visit ( $p = 0.427$ ). Similarly, at the final study visit, no significant differences in mean BCVA were found between eyes that showed increased severity on ETDRS levels versus those without DR level change ( $p = 0.490$ ). Four of these eyes developed CSME, none of which had subclinical DME at baseline.

Of the 38 eyes/patients with subclinical DME at baseline, 35 eyes/patients attended the 6-month visit. At that time, BCVA had decreased by  $\geq 5$  letters in 21 eyes (60%), was maintained in 7 (20%) and increased by  $\geq 5$  letters in 7 (20%). CPT decreased in 45.7% of eyes ( $n = 16$ ; below the subclinical DME definition limits), was within subclinical limits in 51.4% ( $n = 18$ ) and exceeded  $300 \mu\text{m}$  in 2.9% ( $n = 1$ ), although without a clinical diagnosis of CSME. Thirty-two eyes/patients completed the study follow-up, i.e. reached the primary study outcome (between the 6- and 24-month visits) or attended the 24-month visit (with or without reaching the outcome). Among these, progression to CSME was clinically detected in 6 eyes, in 3 between month 6 and month 24 and in the other 3 at the 2-year visit.

In the regression analysis, patients with subclinical DME at baseline showed a risk of progression to CSME 3.686 times higher than that of patients without subclinical DME at baseline (95% confidence interval 1.261–10.771;  $p = 0.017$ ). Moreover, for each 1% increase in HbA<sub>1c</sub> level, the risk of developing CSME increases by a factor of 1.567 (95% confidence interval 1.120–2.191;  $p = 0.009$ ). No other patient or systemic factor, such as age, gender, systolic or diastolic BP, or cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol or triglyceride levels, predicted progression to CSME (table 2).

In the group of patients without subclinical DME at baseline ( $n = 372$ ), 341 attended the 6-month visit (21 presenting subclinical DME and 1 eye with CPT  $>300 \mu\text{m}$ ), and of the 316 that completed follow-up, 296 (93.7%) showed no evidence of CSME on clinical evaluation at either visit. CSME was detected in 14 eyes between the 6- and 24-month visits and in 6 eyes at 2 years. Eyes that developed CSME showed a decrease in mean BCVA, from  $86 \pm 4.5$  to  $82.8 \pm 11.1$  letters ( $p = 0.054$ ), and an increase in mean CPT, from  $188.2 \pm 19.4$  to  $227.6 \pm 135.8 \mu\text{m}$  ( $p = 0.681$ ), at the baseline and final visit, respectively.

At the final visit, eyes with subclinical DME at baseline ( $n = 32$ ) showed a more significant decrease in BCVA when compared with those without subclinical DME ( $n = 316$ ;  $p = 0.012$ ).

**Table 2.** Logistic regression analysis for CSME development

	Odds ratio	95% confidence interval		p
		lower limit	upper limit	
Age (years)	1.012	0.954	1.074	0.68
Gender (male/female)	0.831	0.335	2.060	0.69
Diabetes duration (years)	1.009	0.927	1.098	0.83
HbA <sub>1c</sub> (%)	1.567	1.120	2.191	0.009
SBP (mm Hg)	1.001	0.976	1.027	0.91
DBP (mm Hg)	0.991	0.944	1.040	0.72
Glucose (mg/dl)	0.994	0.987	1.002	0.19
Cholesterol (mg/dl)	0.996	0.952	1.041	0.85
HDL cholesterol (mg/dl)	0.981	0.927	1.038	0.51
LDL cholesterol (mg/dl)	1.013	0.960	1.068	0.64
Triglycerides (mg/dl)	0.996	0.990	1.002	0.24
Subclinical DME (yes/no)	3.686	1.261	10.771	0.02
Constant	0.009	0.000	3.801	0.13

SBP = Systolic BP; DBP = diastolic BP; HDL = high-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein.

## Discussion

In a large cohort of patients with type 2 diabetes, mild NPDR and ETDRS levels of 20 or 35, considering only 1 eye per patient, without prior treatment for DME, we found an overall prevalence of subclinical DME, defined as an absence of foveal edema on slit-lamp examination and a Stratus OCT-based CPT between 225 and  $299 \mu\text{m}$ , of 9.3%. Follow-up of these patients during a period of 2 years or until development of CSME allowed a better understanding of the influence of systemic and ocular characteristics with regard to progression of retinal disease to CSME. Our results suggest that the presence of subclinical DME at baseline and the patient's metabolic control, as evaluated by HbA<sub>1c</sub> levels, are predictors of progression to CSME.

Prior to our study, the DRCR.net found a prevalence of subclinical DME of 4.8% in 582 participants with type 1 or 2 diabetes and mild NPDR (ETDRS retinopathy severity level  $\geq 35$ ) [5]. This study group proposed the definition of subclinical DME that was used in this study. In this definition, the limit of retinal thickness above which eyes are classified as having subclinical DME ( $225 \mu\text{m}$ ) was based on previous retinal thickness measurements obtained in eyes without DR or with mild DR, being 2 SDs above the mean CPT of those diabetics [10]. The upper limit ( $299 \mu\text{m}$ ) corresponds to what was considered the threshold for clinical detection [3].

When analyzing the eyes with subclinical DME, in the interval between baseline and the 6-month visit, 60.0% lost BCVA  $\geq 5$  letters, while 20.0% maintained the initial visual acuity score and 20.0% improved by  $\geq 5$  letters. CPT decreased in 45.7% of these eyes and remained within subclinical DME criteria in 51.4%.

Among the 32 eyes/patients with subclinical DME at baseline who completed the study follow-up, 6 progressed to CSME and received treatment (3 between the 6- and 24-month visits and the other 3 at the 24-month visit). When this group of 6 eyes with subclinical DME at baseline reached the outcome (CSME), there was an overall BCVA decrease and CPT increase, but these differences were not significant. Even though there is a trend favoring vision loss and an increase in central foveal thickness, on OCT, the results were not significant, probably due to the small sample size, which was insufficient to identify major differences. However, it is noteworthy that, when considering all eyes with subclinical DME at baseline, these eyes, when compared with eyes without subclinical DME at baseline, showed a significant decrease in visual acuity, indicating that the presence of subclinical DME is associated with future vision loss.

Disease progression, represented by a change in the level of DR severity, was evaluated clinically and on CFP of the 7 fields, using the ETDRS scale. Retinal level progression was detected in 15 eyes, from level 35 (mild NPDR) to level 43 (moderate NPDR), with only 2 of these showing subclinical DME at baseline. In this subset of eyes, there was no significant vision loss, and their final BCVA letter score was not different from that of the eyes that did not progress on the ETDRS scale. Vision loss observed in this study was, therefore, associated with retinal edema, identified by increased foveal thickening. This is in agreement with prior evidence from trials of ruboxistaurin, an orally administered inhibitor of protein kinase C- $\beta$ , in DME patients, which showed that the most probable cause of sustained moderate vision loss in the eyes in their study was the presence of increased retinal thickening involving the center of the macula [11, 12]. It is generally accepted that, in the initial stages of clinical DR, increased retinal thickness is associated with an early alteration of the inner blood-retinal barrier [13, 14]. The resultant accumulation of fluid in the retinal layers around the fovea may lead to vision loss by altering the functional cell relationship in the retina and/or by promoting an inflammatory reparative response [14].

Furthermore, there have also been reports of retinal ganglion cell death and axonal degeneration occurring in the initial stages of DR [15]. It is possible that both disease processes, neuronal degeneration and breakdown of the

inner blood-retinal barrier, occur in variable degrees in different patients in the initial stages of DR. Therefore, it is possible that increased thickness may be masked in some eyes that have more neuronal degeneration.

This study showed that eyes with subclinical DME at baseline have a 3.686-fold increased risk of progressing to CSME within a period of 2 years after its detection. Two previous studies have reported the natural course of eyes with subclinical DME. In the DRCR.net study [5], 75.0% of the eyes with subclinical DME met primary study outcome criteria by 1 year, and an estimated 38.0% by 2 years. Browning and Fraser [7], using a different definition of subclinical DME (macular edema clinically less than the CSME threshold, but detected by OCT – abnormal thickness in 1 of 9 OCT zones, abnormal total macular volume or abnormal comparison of 2 OCT zones), found, over a median follow-up of 14 months, progression to CSME in 48 of 153 eyes (31.4%). They also found spontaneous improvement of macular edema over time in a substantial fraction of eyes, as we did [7].

We found that for every 1% increase in HbA<sub>1c</sub> level, the risk of developing CSME increases by a factor of 1.567. In this study, no other systemic factor predicted progression to CSME.

Subclinical DME is a relatively uncommon finding [5]. Nevertheless, when detected, the management of the patient should change. Early detection of DME is highly desirable, with the aim of preserving photoreceptors at early disease stages and retaining central visual acuity. Timely treatment for DME may be able to prevent loss of visual acuity associated with prolonged structural damage. These patients should, at least, be monitored more frequently to determine when the threshold for intervention is reached.

### Acknowledgements

Financial support was granted by Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal, for the research project PTDC/SAU-OSM/72635/2006 (trial registry NCT00763802, ClinicalTrials.gov).

### Disclosure Statement

I. Pires, A.R. Santos, S. Nunes, C. Lobo and J. Cunha-Vaz work at AIBILI.

J. Cunha-Vaz is President of the Administration Board of AIBILI and Emeritus Professor of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra. He is also a consultant for Allergan, Alimera Sciences, Bayer, Critical Health, Fovea Pharmaceuticals, Gene Signal, Novartis, Pfizer and Roche.

## References

- 1 Paunescu LA, Schuman JS, Price LL, Stark PC, Beaton S, Ishikawa H, Wollstein G, Fujimoto JG: Reproducibility of nerve fiber thickness, macular thickness, and optic nerve head measurements using StratusOCT. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1716–1724.
- 2 Krzystolik MG, Strauber SF, Aiello LP, Beck RW, Berger BB, Bressler NM, Browning DJ, Chambers RB, Danis RP, Davis MD, Glassman AR, Gonzalez VH, Greenberg PB, Gross JG, Kim JE, Kollman C; Diabetic Retinopathy Clinical Research Network: Reproducibility of macular thickness and volume using Zeiss optical coherence tomography in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2007;114:1520–1525.
- 3 Brown JC, Solomon SD, Bressler SB, Schachat AP, DiBernardo C, Bressler NM: Detection of diabetic foveal edema: contact lens biomicroscopy compared with optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 2004;122:330–335.
- 4 Browning DJ, Fraser CM, Clark S: The relationship of macular thickness to clinically graded diabetic retinopathy severity in eyes without clinically detected diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2008;115:533–539.
- 5 Bressler NM, Miller KM, Beck RW, Bressler SB, Glassman AR, Kitchens JW, Melia M, Schlossman DK; Diabetic Retinopathy Clinical Research Network: Observational study of subclinical diabetic macular edema. *Eye (Lond)* 2012;26:833–840.
- 6 Sng CC, Cheung CY, Man RE, Wong W, Lavanya R, Mitchell P, Aung T, Wong TY: Influence of diabetes on macular thickness measured using optical coherence tomography: the Singapore Indian Eye Study. *Eye (Lond)* 2012;26:690–698.
- 7 Browning DJ, Fraser CM: The predictive value of patient and eye characteristics on the course of subclinical diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 2008;145:149–154.
- 8 Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Arch Ophthalmol* 1985;103:1796–1806.
- 9 Early Treatment Diabetic Retinopathy Study design and baseline patient characteristics. ETDRS report number 7. *Ophthalmology* 1991;98(5 suppl):741–756.
- 10 Bressler NM, Edwards AR, Antoszyk AN, Beck RW, Browning DJ, Ciardella AP, Danis RP, Elman MJ, Friedman SM, Glassman AR, Gross JG, Li HK, Murtha TJ, Stone TW, Sun JK; Diabetic Retinopathy Clinical Research Network: Retinal thickness on Stratus optical coherence tomography in people with diabetes and minimal or no diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2008;145:894–901.
- 11 Sheetz MJ, Aiello LP, Davis MD, Danis R, Bek T, Cunha-Vaz J, Shahri N, Berg PH; MBDD and MBCU Study Groups: The effect of the oral PKC  $\beta$  inhibitor ruboxistaurin on vision loss in two phase 3 studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:1750–1757.
- 12 Aiello LP, Vignati L, Sheetz MJ, Zhi X, Girach A, Davis MD, Wolka AM, Shahri N, Milton RC; PKC-DRS and PKC-DRS2 Study Groups: Oral protein kinase c  $\beta$  inhibition using ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the Protein Kinase C  $\beta$  Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study and the Protein Kinase C  $\beta$  Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study 2. *Retina* 2011;31:2084–2094.
- 13 Lobo CL, Bernardes RC, Figueira JP, Faria de Abreu JR, Cunha-Vaz JG: Three-year follow-up of blood retinal barrier and retinal thickness alterations in patients with type 2 diabetes mellitus and mild nonproliferative retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2004;122:211–217.
- 14 Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C: Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol* 2011;21(suppl 6):S3–S9.
- 15 van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PH, Stehouwer M, Garvin MK, Sonka M, DeVries JH, Schlingemann RO, Abràmoff MD: Early neurodegeneration in the retina of type 2 diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:2715–2719.

## Capítulo IV





## 6. Conclusões

**1.** O Retinal Thickness Analyzer (RTA) é um método não invasivo, objetivo, que permite quantificar a espessura da retina. Mostrou-se particularmente útil e sensível para avaliar a espessura da retina em indivíduos normais e nas fases iniciais da RD, para detetar alterações mínimas e localizadas da espessura macular, traduzindo a disfunção endotelial e rutura da BHR que ocorre precocemente na retina de indivíduos diabéticos. Deixou, no entanto, de ser usado na prática clínica pois foi suplantado pelo Optical Coherence Tomography (OCT), que proporciona mais informação sobre as alterações estruturais da retina, e é particularmente superior nas formas mais avançadas de EMD, para as quais há tratamento disponível.

Foi observada uma elevada correlação entre a espessura da retina determinada pelo RTA e pelo OCT em grupos de indivíduos normais e diabéticos, em particular nas fases iniciais da RD. No entanto, o sistema do RTA parece ser sensível à opacidade dos meios e ao aumento da espessura da retina em edemas mais marcados, bem como, à progressão do nível de RD e lesões associadas (nomeadamente exsudatos duros), mostrando nestas fases mais avançadas problemas de segmentação e aquisição quantitativa.

O OCT e o RTA “nasceram” aproximadamente na mesma altura, fruto da investigação e mérito de equipas de investigação, e representaram avanços notáveis face a métodos pré existentes, ao permitirem a quantificação da espessura da retina. No entanto, com o tempo, e face à possibilidade do OCT permitir adicionalmente uma análise qualitativa associada à informação sobre a estrutura morfológica da retina, o uso do RTA foi claramente preterido em relação ao OCT. Ficou, para os nossos dias, o OCT.

**2.** O OCT é um método não invasivo, que se baseia no princípio da interferometria de baixa coerência ótica, medindo o tempo de atraso e intensidade de luz refletida por microestruturas nos tecidos. O OCT proporciona em tempo real e in vivo informação

quantitativa da espessura macular, de forma precisa e reprodutível; permite avaliar a arquitetura da retina, ao delinear as camadas que a constituem e expor padrões de alterações morfológicas na retina que se associam às patologias; analisar a interface vitreomacular e a forma como se correlaciona com a patologia macular; quantificar a coroideia (mais recentemente) e quantificar e avaliar a estrutura do nervo ótico. Por isso, tem sido crescentemente usado, na prática clínica e na investigação, para identificar as fases do desenvolvimento do buraco macular, relações vitreoretinianas, presença de fluido intra e subretiniano, doenças do EPR e neovascularização coroideia de diferentes etiologias.

Vários estudos têm mostrado que o OCT mede a espessura da retina de forma precisa e reprodutível num dado indivíduo, entre exames consecutivos e entre diferentes operadores (treinados com a técnica), ao longo da evolução natural ou após tratamento, enquanto simultaneamente permite a visualização da microestrutura da retina.

A informação do OCT complementa de forma objetiva a informação clínica, baseada nas fotografias a cores do fundo ocular e nos achados angiográficos, pelo que desde a sua introdução mais generalizada em oftalmologia, que coincidiu com a comercialização do OCT Stratus em 2002, se tornou num método de diagnóstico indispensável e amplamente usado. Atualmente, “ver” somente já não é suficiente para o médico, nem para o doente, nem para o futuro da oftalmologia.

**3.** No EMD, o OCT é útil no diagnóstico inicial e na decisão terapêutica, para decidir o re-tratamento e qual a intervenção mais adequada. Permite quantificar a eficácia longitudinal do tratamento e as alterações estruturais induzidas. Atualmente tem sido incluído em todos os protocolos de ensaios clínicos no EMD.

Nos últimos anos, o sistema de OCT evoluiu rápida e dramaticamente. Os sistemas TD deram lugar aos sistemas SD, mais rápidos, com melhor reprodutibilidade e maior resolução.

O OCT SD tem permitido uma melhor compreensão da fisiopatologia e do desenvolvimento e progressão do EMD, avaliar a morfologia dos vários tipos de EMD, e visualizar lesões intrarretinianas que caracterizam a RD. Permite quantificar a espessura e volume da retina e das suas camadas; localizar o aumento de espessura nas camadas intrarretinianas; identificar pequenas áreas maculares com aumento da espessura e volume.

**4.** Uma das características fundamentais nos sistemas de OCT é a sua reconhecida capacidade para detetar precocemente o edema macular, antes mesmo de ser clinicamente aparente. O conhecimento e caracterização das fases mais precoces do envolvimento da retina no contexto da diabetes desde sempre motivaram o nosso grupo de investigação. Só o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na rutura da BHR e na disfunção endotelial, que levarão ao edema da mácula, e que, sabemos, caracterizam as fases mais iniciais da RD, e dos fatores oculares e sistémicos que lhe estão associados, poderão permitir avaliar a eficácia e o impacto de modalidades terapêuticas existentes e em desenvolvimento. No indivíduo diabético, o objetivo primordial deve ser evitar o aparecimento e, depois, a progressão das lesões oculares, controlando os fatores que lhe estão associados. É necessário a sua identificação. E o OCT tem dado importantes contributos nesta direção.

Lembramos que a RD evolui de forma muito variável entre indivíduos diferentes, mesmo quando submetidos a controlo metabólico idêntico.

**5.** Neste sentido, mostrámos pela primeira vez, em 2002, usando o RTA e um sistema de OCT de primeira geração, que existem precocemente na retina de indivíduos diabéticos tipo 2, assintomáticos, áreas de aumento da espessura macular, não observadas clinicamente, refletindo as alterações microvasculares precoces da RD, e que a sua presença aumenta no nível subsequente de gravidade da RD. Nesta altura, no grupo de doentes incluídos (níveis de gravidade de RD de 10, 20 e 35), o RTA foi mais sensível que o OCT para a sua deteção. Notámos, também, que a sua presença

não é universal, pois vários doentes não mostraram áreas com edema, clinicamente ou nos métodos objetivos.

**6.** Mais recentemente, num estudo que envolveu a inclusão de indivíduos com DM tipo 2, em 410 olhos com lesões de RDNP ligeira na fundoscopia (níveis 20/35 ETDRS) e sem edema macular (research project PTDC/SAU-OSM/72635/2006 (trial registry NCT00763802, [ClínicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov))), mostrámos que a espessura da retina macular central (CST), obtida com o OCT Stratus, é, em média, superior à de uma população normal, com idade comparável. Os nossos dados estão em aparente contradição com algumas publicações prévias, que documentaram, nas fases mais precoces da RD, uma diminuição da espessura macular, refletindo o processo neurodegenerativo precoce, ou ausência de alteração dos valores de espessura da retina face aos grupos controlo (normais). Neste contexto, encontrámos, no nosso grupo, analisando individualmente, evidência de diminuição da espessura da retina em 2.9% dos olhos, espessura da retina normal em 79.5% dos olhos e aumento da espessura, ou seja, edema (subclínico, não detetado clinicamente), em 17.6% dos olhos. Encontrámos evidência de que, nas fases iniciais da RD, a degeneração neuronal e as alterações microvasculares podem ocorrer diferentemente entre diferentes indivíduos diabéticos. A presença de aumentos focais da espessura da retina por disfunção microvascular (alteração da BHR), observada nas fases iniciais da doença retiniana na diabetes, pode, efetivamente, mascarar a perda celular neuronal e glial.

Neste estudo limitámos a nossa análise da espessura ao ponto central da mácula (valor de CPT) e ao campo macular central (valor de CST), por serem os valores de espessura que melhor se correlacionam com a AV central. Estão, no entanto, a decorrer estudos para avaliar a forma como a espessura da retina macular central, parafoveal e perifoveal se correlacionam nas fases iniciais da RD e do EMD, particularmente usando as recentes funcionalidades proporcionadas pelos sistemas de OCT SD. Espera-se que o uso destes sistemas, que permitem visualizar e avaliar, quantitativa e morfológicamente, as camadas individuais da retina neurosensorial e da retina externa (complexo fotorreceptores-EPR), permitam compreender quais as

camadas preponderantemente afetadas pela diabetes, e a relação espacial e temporal do seu envolvimento, no decurso da doença sistémica.

**7.** Para caracterizar a história natural do EMD subclínico fomos analisar a sua progressão para EMCS e necessidade de tratamento, durante um período observacional de 2 anos, e quais os fatores oculares e sistémicos associados. Para tal, procurámos no grupo de 410 olhos/doentes incluídos num estudo prospetivo e longitudinal, quais os que apresentavam EMD subclínico na visita inicial, de acordo com a definição que usámos, proposta pelo DRCR.net, que consiste na ausência de edema envolvendo a fóvea, na observação biomicroscópica na lâmpada de fenda, e valor de CPT  $\geq 225 \mu\text{m}$  e  $\leq 299 \mu\text{m}$ , com o OCT Stratus. No grupo de 410 olhos, encontramos 38 olhos, 9.3%, que cumpriam os critérios de EMD subclínico. O seguimento destes olhos durante 2 anos ou até ao desenvolvimento de EMCS, com necessidade de tratamento, permitiu-nos conhecer melhor os fatores associados. Assim, dos 38 olhos com EMD subclínico inicialmente identificados, 32 completaram o seguimento desejado e 6 desenvolveram EMCS, ao longo de um período de 2 anos desde a sua identificação. Nos olhos com EMD subclínico constatámos um risco de progressão para EMCS 3.686 vezes superior ao de olhos sem EMD subclínico inicial, e observámos, também, que cada 1% de aumento do valor de HbA1c aumenta por um fator de 1.567 o risco de progressão para EMCS.

Os nossos resultados mostraram claramente que a presença de EMD subclínico e o controlo metabólico, avaliado pelos níveis de HbA1c, em diabéticos tipo 2, preveem um maior risco de progressão para EMCS. São, por isso, marcadores de progressão. Este estudo confirmou as observações de estudos prévios sobre a história natural do EMD subclínico. Ou seja, estudos independentes validaram o EMD subclínico em doentes diabéticos como um biomarcador relacionado com a doença, com valor prognóstico para o desenvolvimento de EMCS.

A identificação de EMD subclínico é indicação segura para intensificar o controlo metabólico e da pressão arterial, cada 3 meses pelo menos, tentando atingir e manter

um valor de HbA1c < 7.1%, uma pressão arterial sistólica < 140 mmHg e uma pressão arterial diastólica < 85 mmHg, em estreita colaboração com o médico assistente (endocrinologista/internista/medicina geral).

É também uma indicação para realizar exames oftalmológicos com periodicidade mais frequente, pelo menos cada 6 meses, para detetar precocemente o limiar de tratamento e qual a terapêutica mais adequada de acordo com a morfologia do OCT, e evitar perda visual futura associada a lesão estrutural prolongada. O objetivo do tratamento pode ser parar, atrasar ou limitar a progressão do aumento da espessura da retina para EMCS.

**8.** O EMD é a complicação da RD que mais frequentemente se correlaciona com a perda de AV na DM, em particular na DM tipo 2, e pode surgir desde as fases mais iniciais da RD. Por outro lado, a eficácia do tratamento do EMD depende da precocidade com que é instituído. O diagnóstico precoce do EMD é, pois, fundamental.

A avaliação clínica do edema macular tem sido caracterizada pela subjetividade e variabilidade entre médicos, dificuldade na identificação das fases mais iniciais de edema da retina ou incapacidade para detetar pequenas alterações da espessura da retina, nomeadamente decorrentes de intervenção terapêutica, factos amplamente reconhecidos na literatura. Ao longo do tempo, surgiu a necessidade de medir objetivamente, quantificar, a espessura da retina.

O aparecimento do OCT permitiu uma avaliação quantitativa, e portanto objetiva, da espessura da retina, bem como um registo permanente, e tornou-se um método imagiológico essencial e crescentemente usado, na prática clínica e investigação, em doentes com patologia da retina, e em particular com EMD. Tem permitido o diagnóstico precoce de EMD, denominado EMD subclínico, identificado antes da perceção clínica ou fotográfica de aumento de espessura da retina na área macular.

Atualmente, na prática clínica, a decisão clínica de diagnóstico, tratamento e re-tratamento baseia-se na conjugação dos achados obtidos em fundamentalmente 3 avaliações, realizadas de forma não invasiva: a determinação da AV, a classificação das fotografias a cores do fundo ocular e a medição da espessura da retina e avaliação da morfologia intrarretiniana, no OCT. Similarmente, no decurso de ensaios clínicos, os critérios de inclusão, tratamento e re-tratamento baseiam-se maioritariamente nestes achados, obtidos de forma não invasiva. A adição de meios imagiológicos adicionais, nomeadamente a AF (invasiva), fica ao critério do investigador, reservada para casos selecionados, pontuais. O uso do OCT poderá, inclusivamente, ser alargado aos protocolos de rastreio da RD.

Face ao uso crescente e difundido do OCT, surgiu a necessidade de estabelecer parâmetros quantitativos de espessura da retina, ou seja, valores de “corte” que permitam presumir, num indivíduo diabético, uma espessura da retina anormal: diminuída, por degeneração neuronal, ou aumentada, por edema, consequência da rutura da BHR. Estes parâmetros quantitativos constituem as bases normativas, estabelecidas em populações normais, para cada sistema de OCT em particular, face às diferenças entre sistemas TD e SD. Nos ensaios clínicos em EMD as bases normativas são essenciais para o desenho do estudo e interpretação dos resultados.

No nosso centro contribuímos para o desenvolvimento das seguintes definições e valores referência:

- Ponto central – ponto central na fóvea, local de interseção dos 6 *scans* radiários, quando se usa o protocolo de aquisição *fast macular thickness* do OCT Stratus TD;
- *Central point thickness* - CPT – valor médio de espessura da retina no ponto central da fóvea, adquirido com o protocolo de aquisição *fast macular thickness* do OCT Stratus TD e com os protocolos volume scan do OCT Spectralis SD;

- Campo macular central - área macular central com 1000  $\mu\text{m}$  de diâmetro, no mapa de 9 áreas tipo ETDRS fornecido pelo *software* dos sistemas de OCT, TD e SD;
- *Central subfield thickness* – CST – média da espessura da retina no campo macular central;
- Intervalos referência de espessura da retina normal - valores normais  $\pm 2$  DP:
  - OCT Stratus TD - CPT 130 – 210  $\mu\text{m}$ , CST – 160 - 240  $\mu\text{m}$ ;
  - OCT Cirrus SD;
    - Globais CST – 220 - 300  $\mu\text{m}$ ;
    - Homens CST – 239 - 304  $\mu\text{m}$ ;
    - Mulheres CST – 215 - 282  $\mu\text{m}$ ;
  - OCT Spectralis SD - CST – 225 - 315  $\mu\text{m}$ ;
- Valores de “corte” para detecção de aumento de espessura da retina em indivíduos diabéticos, isto é, presumir a presença de edema, na área macular central (CST), com base nos valores propostos pelo DRCR.net:
  - OCT Stratus  $\geq 250$   $\mu\text{m}$ ;
  - OCT Cirrus;
    - Homens  $\geq 305$   $\mu\text{m}$ ;
    - Mulheres  $\geq 290$   $\mu\text{m}$ ;
  - OCT Spectralis;
    - Homens  $\geq 320$   $\mu\text{m}$ ;
    - Mulheres  $\geq 305$   $\mu\text{m}$ ;
  - EMD Subclínico;
    - OCT Stratus - CPT  $\geq 225 \leq 299$   $\mu\text{m}$ ;
    - OCT Cirrus;
      - Homens: CST  $\geq 240$   $\mu\text{m} \leq 305$   $\mu\text{m}$ ;
      - Mulheres: CST  $\geq 240$   $\mu\text{m} \leq 290$   $\mu\text{m}$ ;
    - OCT Spectralis;
      - Homens: CST  $\geq 250$   $\mu\text{m} \leq 320$   $\mu\text{m}$ ,
      - Mulheres: CST  $\geq 250$   $\mu\text{m} \leq 305$   $\mu\text{m}$ .



**9.** Atualmente, a DM afeta cerca de 8.3% da população adulta, e estima-se que nos próximos anos este número continue a aumentar. A RD é uma complicação frequente da DM, e as formas não complicadas de RD progridem ao longo do tempo (quase) sem alteração da AV. A perda de AV na RD é tardia, surge numa minoria de doentes, na sequência de 2 complicações principais da RD: o EMD e a RDP.

Atualmente, o desafio consiste em tratar e interromper a progressão da doença antes do aparecimento das complicações que ameaçam a visão, o EMCS e a RDP, ou pelo menos, logo que estas surjam. A progressão da RD não é linear, variando muito entre diferentes indivíduos.

Os biomarcadores podem ser usados para diagnosticar o risco de doença, presença de doença num determinado indivíduo ou personalizar o tratamento de uma doença a um determinado indivíduo. Os biomarcadores tornaram-se a base da medicina preventiva, e são a chave para uma medicina personalizada no futuro.

O nosso grupo de investigação tem realizado vários estudos clínicos, nas fases iniciais da RD, que têm permitido a investigação e identificação de potenciais biomarcadores de progressão da RD para formas complicadas da doença, que ameaçam a visão, em particular para EMCS.

O *turnover* de MAs, avaliado nas fotografias a cores do fundo ocular, de forma não invasiva, parece ser um biomarcador da progressão geral da doença vascular retiniana (Ribeiro *et al.* 2013). O *turnover* de MAs detetado com o RetmarkerDR poderá ser uma indicação direta da atividade da doença microvascular retiniana, facto constatado por outro grupo de estudo, independente.

O EMD subclínico, identificado quantitativamente com o OCT (Pires, Santos, Nunes, Lobo, *et al.* 2013), também parece ser um promissor candidato para biomarcador de progressão da RD para EMCS. As medições de espessura da retina são reprodutíveis, e a alteração da espessura da retina é uma indicação direta da presença

de edema macular e da rutura da BHR. Este biomarcador de progressão da RD para EMCS também foi validado por estudos independentes.

O eletrorretinograma multifocal também parece ser um método imagiológico promissor para detetar alterações funcionais precoces na RD, e prever não só olhos, mas também localizações retinianas, que desenvolverão sinais de retinopatia microvascular no futuro próximo. O uso deste método, e a avaliação do seu potencial, são atualmente objeto de um grande estudo clínico europeu, ainda a decorrer, o EUROCONDOR (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01726075).

O nosso grupo de investigação também procurou identificar biomarcadores preditivos da resposta do EMCS ao tratamento com agentes anti-VEGF, usando o OCT SD. O grau de diminuição dos valores da espessura macular central, medidos com o OCT SD, correlacionaram-se bem com a melhoria da AV (Santos *et al.* 2014). Ou seja, no grupo de doentes com EMCS estudado, a percentagem de diminuição da espessura da retina inicial, avaliada com o OCT SD, pareceu um bom candidato para biomarcador preditivo da resposta da AV a agentes anti-VEGF intra-vítreos. No entanto, estes dados requerem confirmação em estudos de maior dimensão.

Finalmente, do ponto de vista sistémico, o valor de HbA1c permanece como o único biomarcador validado com valor prognóstico para a progressão da RD.

Espera-se que a identificação e validação de biomarcadores contribua para o desenho de ensaios clínicos capazes de avaliar a eficácia de novas drogas que possam interromper a progressão da RD nas fases iniciais da doença. Espera-se que o conhecimento de biomarcadores preditivos e prognósticos permitam a implementação de uma medicina personalizada no futuro próximo.

Esperamos assim poder atrasar ou prevenir as complicações da RD que ameaçam a visão e preservá-la.

## Referências

- Abordo, E.A. & Thornalley, P.J., 1997. Synthesis and secretion of tumour necrosis factor- $\alpha$  by human monocytic THP-1 cells and chemotaxis induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. *Immunology letters*, 58(3), pp.139–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293394> [Accessed March 20, 2014].
- Abu-El-Asrar, A.M. et al., 2004. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(8), pp.2760–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15277502> [Accessed April 22, 2014].
- ADA, 2003. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 26 Suppl 1, pp.S5–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502614> [Accessed February 1, 2014].
- Adamis, A.P., 2002. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *The British journal of ophthalmology*, 86(4), pp.363–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1771111&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 30, 2014].
- Ahola, A.J. et al., 2010. Health-related quality of life in patients with type 1 diabetes--association with diabetic complications (the FinnDiane Study). *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 25(6), pp.1903–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20037167> [Accessed June 19, 2014].
- Aiello, L.M. et al., 1981. Diabetic retinopathy in Joslin Clinic patients with adult-onset diabetes. *Ophthalmology*, 88(7), pp.619–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6167924> [Accessed February 23, 2014].
- Aiello, L.P. et al., 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *The New England journal of medicine*, 331(22), pp.1480–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7526212> [Accessed January 30, 2014].
- Aiello, L.P. et al., 1997. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes*, 46(9), pp.1473–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287049> [Accessed January 30, 2014].
- Aiello, L.P. et al., 1998. Diabetic retinopathy. *Diabetes care*, 21(1), pp.143–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9538986> [Accessed February 4, 2014].
- Aiello, L.M., 2003. Perspectives on diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology*, 136(1), pp.122–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834680> [Accessed April 25, 2014].
- Aiello, L.P., Vignati, L., et al., 2011. Oral protein kinase c  $\beta$  inhibition using ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the Protein Kinase C  $\beta$  Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study and the

- Protein Kinase C  $\beta$  Inhibit. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31(10), pp.2084–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21862954> [Accessed June 3, 2014].
- Aiello, L.P., Beck, R.W., et al., 2011. Rationale for the diabetic retinopathy clinical research network treatment protocol for center-involved diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 118(12), pp.e5–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3253487&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 12, 2014].
- Ajoy Mohan, V.K., Nithyanandam, S. & Idiculla, J., 2011. Microalbuminuria and low hemoglobin as risk factors for the occurrence and increasing severity of diabetic retinopathy. *Indian journal of ophthalmology*, 59(3), pp.207–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3120240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
- Alamouti, B. & Funk, J., 2003. Retinal thickness decreases with age: an OCT study. *The British journal of ophthalmology*, 87(7), pp.899–901. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1771773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 1, 2014].
- Alasil, T. et al., 2010. Relationship between optical coherence tomography retinal parameters and visual acuity in diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 117, pp.2379–2386.
- Alkuraya, H., Kangave, D. & Abu El-Asrar, A.M., 2005. The correlation between optical coherence tomographic features and severity of retinopathy, macular thickness and visual acuity in diabetic macular edema. *International ophthalmology*, 26(3), pp.93–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063373> [Accessed May 6, 2014].
- Ambrosius, W.T. et al., 2010. Lack of association between thiazolidinediones and macular edema in type 2 diabetes: the ACCORD eye substudy. *Archives of ophthalmology*, 128(3), pp.312–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3010554&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
- Anderson, S. et al., 2003. Ambulatory photographic screening for diabetic retinopathy in nursing homes. *Eye (London, England)*, 17(6), pp.711–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928682> [Accessed June 14, 2014].
- Andreoli, C.M. & Miller, J.W., 2007. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Current opinion in ophthalmology*, 18(6), pp.502–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18163003> [Accessed July 16, 2014].
- Antcliff, R.J. & Marshall, J., 1999. The pathogenesis of edema in diabetic maculopathy. *Seminars in ophthalmology*, 14(4), pp.223–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758223> [Accessed May 12, 2014].
- Antcliff, R.J., Hussain, A.A. & Marshall, J., 2001. Hydraulic conductivity of fixed retinal tissue after sequential excimer laser ablation: barriers limiting fluid distribution and implications for cystoid macular edema. *Archives of ophthalmology*, 119(4), pp.539–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11296019> [Accessed April 26, 2014].

- Antonetti, D.A. et al., 1998. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*, 47(12), pp.1953–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9836530> [Accessed April 21, 2014].
- Antonetti, D.A. et al., 1999. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), pp.23463–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438525> [Accessed February 15, 2014].
- Antonetti, D.A. et al., 2002. Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *Journal of neurochemistry*, 80(4), pp.667–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841574> [Accessed April 21, 2014].
- Antonetti, D.A., Klein, R. & Gardner, T.W., 2012. Diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine*, 366(13), pp.1227–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22455417> [Accessed May 27, 2014].
- Arar, N.H. et al., 2008. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: the FIND-Eye study. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(9), pp.3839–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2583147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 21, 2014].
- Arden, G.B. et al., 1986. Pattern electroretinograms become abnormal when background diabetic retinopathy deteriorates to a preproliferative stage: possible use as a screening test. *The British journal of ophthalmology*, 70(5), pp.330–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1041011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 3, 2014].
- Arend, O. et al., 1997. Contrast sensitivity loss is coupled with capillary dropout in patients with diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 38(9), pp.1819–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9286271> [Accessed April 16, 2014].
- Arevalo, J.F. et al., 2009. Primary intravitreal bevacizumab for diffuse diabetic macular edema: the Pan-American Collaborative Retina Study Group at 24 months. *Ophthalmology*, 116(8), pp.1488–97, 1497.e1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19545900> [Accessed May 12, 2014].
- Arora, S. et al., 2012. Trends in the incidence of visual impairment certification secondary to diabetic retinopathy in the Leeds metropolitan area, 2005-2010. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 29(7), pp.e112–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22356276> [Accessed June 30, 2014].
- Asefzadeh, B., Cavallerano, A.A. & Fisch, B.M., 2007. Racial differences in macular thickness in healthy eyes. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*, 84(10), pp.941–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18049358> [Accessed May 1, 2014].

- Asefzadeh, B. et al., 2008. Macular thickness and systemic markers for diabetes in individuals with no or mild diabetic retinopathy. *Clinical & experimental ophthalmology*, 36(5), pp.455–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18925914> [Accessed June 4, 2014].
- Ashton, N., 1974. Vascular basement membrane changes in diabetic retinopathy. Montgomery lecture, 1973. *The British journal of ophthalmology*, 58(4), pp.344–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1214780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 15, 2014].
- Asrani, S. et al., 1999. Noninvasive mapping of the normal retinal thickness at the posterior pole. *Ophthalmology*, 106(2), pp.269–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9951475>.
- Bailey, C.C. et al., 1999. The National Diabetic Retinopathy Laser Treatment Audit. III. Clinical outcomes. *Eye (London, England)*, 13 ( Pt 2), pp.151–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10450373> [Accessed May 7, 2014].
- Bandello, F. et al., 2003. Diabetic macular edema: classification, medical and laser therapy. *Seminars in ophthalmology*, 18(4), pp.251–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15513012> [Accessed April 28, 2014].
- Barber, A.J. et al., 1998. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *The Journal of clinical investigation*, 102(4), pp.783–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=508941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 21, 2014].
- Barber, A.J., Antonetti, D.A. & Gardner, T.W., 2000. Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(11), pp.3561–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006253> [Accessed April 21, 2014].
- Barber, A.J., 2003. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 27(2), pp.283–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657367> [Accessed March 24, 2014].
- Barber, A.J., Gardner, T.W. & Abcouwer, S.F., 2011. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(2), pp.1156–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3053099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 25, 2014].
- Barr, C.C., 2001. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive insulin therapy, by The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *N. Engl. J. Med* 34. *Survey of ophthalmology*, 45(5), pp.459–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274700> [Accessed April 29, 2014].
- Barrie, T. & MacCuish, A.C., 1986. Assessment of non-mydratic fundus photography in detection of diabetic retinopathy. *British medical journal (Clinical research ed.)*,

- 293(6557), pp.1304–5. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1342127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2014].
- Barthelmes, D., Gillies, M.C. & Sutter, F.K.P., 2008. Quantitative OCT analysis of idiopathic perifoveal telangiectasia. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(5), pp.2156–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436849> [Accessed May 6, 2014].
- Barthelmes, D., Sutter, F.K.P. & Gillies, M.C., 2008. Differential optical densities of intraretinal spaces. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(8), pp.3529–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441298> [Accessed March 10, 2014].
- Baskin, D.E., 2010. Optical coherence tomography in diabetic macular edema. *Current opinion in ophthalmology*, 21(3), pp.172–7. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224402> [Accessed April 29, 2014].
- Bearse, M.A., Han, Y., Schneck, M.E., Barez, S., et al., 2004. Local multifocal oscillatory potential abnormalities in diabetes and early diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(9), pp.3259–65. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15326149> [Accessed April 17, 2014].
- Bearse, M.A., Han, Y., Schneck, M.E. & Adams, A.J., 2004. Retinal function in normal and diabetic eyes mapped with the slow flash multifocal electroretinogram. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(1), pp.296–304. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691187> [Accessed April 17, 2014].
- Bearse, M.A. et al., 2006. A multifocal electroretinogram model predicting the development of diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*, 25(5), pp.425–48. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2773701&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 25, 2014].
- Bernardes, R. et al., 2009. Computer-assisted microaneurysm turnover in the early stages of diabetic retinopathy. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 223(5), pp.284–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19372722> [Accessed June 15, 2014].
- Best, R.M. & Chakravarthy, U., 1997. Diabetic retinopathy in pregnancy. *The British journal of ophthalmology*, 81(3), pp.249–51. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1722128&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
- Bhisitkul, R.B., 2006. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *The British journal of ophthalmology*, 90(12), pp.1542–7. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1857529&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 16, 2014].
- Bialosterski, C. et al., 2007. Decreased optical coherence tomography-measured pericentral retinal thickness in patients with diabetes mellitus type 1 with minimal diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology*, 91(9), pp.1135–8. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1954913&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 2, 2014].
- Blair, N.P. et al., 1982. Prolongation of the retinal mean circulation time in diabetes. *Archives of ophthalmology*, 100(5), pp.764–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7044352> [Accessed April 3, 2014].
- Blair, N.P. et al., 2008. Correlation between microaneurysms and retinal thickness in diabetic macular edema. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 28(8), pp.1097–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779716> [Accessed April 23, 2014].
- Blom, J.J. et al., 2011. Inhibition of the adrenomedullin/nitric oxide signaling pathway in early diabetic retinopathy. *Journal of ocular biology, diseases, and informatics*, 4(1-2), pp.70–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3342401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 23, 2014].
- Bodansky, H.J. et al., 1982. Diabetic retinopathy and its relation to type of diabetes: review of a retinal clinic population. *The British journal of ophthalmology*, 66(8), pp.496–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1039834&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 23, 2014].
- Boeri, D., Maiello, M. & Lorenzi, M., 2001. Increased prevalence of microthromboses in retinal capillaries of diabetic individuals. *Diabetes*, 50(6), pp.1432–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375345> [Accessed April 18, 2014].
- Bolz, M., Ritter, M., et al., 2009. A systematic correlation of angiography and high-resolution optical coherence tomography in diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 116(1), pp.66–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19118697> [Accessed October 19, 2013].
- Bolz, M., Schmidt-Erfurth, U., et al., 2009. Optical coherence tomographic hyperreflective foci: a morphologic sign of lipid extravasation in diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 116(5), pp.914–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410950> [Accessed May 5, 2014].
- Bolz, M. et al., 2010. In vivo retinal morphology after grid laser treatment in diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 117(3), pp.538–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045563> [Accessed May 5, 2014].
- Boucher, M.C., Nguyen, Q.T. & Angioi, K., 2005. Mass community screening for diabetic retinopathy using a nonmydriatic camera with telemedicine. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 40(6), pp.734–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391638> [Accessed June 14, 2014].
- Boucher, M.C. et al., 2008. Teleophthalmology screening for diabetic retinopathy through mobile imaging units within Canada. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 43(6), pp.658–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19020631> [Accessed June 14, 2014].



- Boyer, D.S. et al., 2009. A Phase IIIb study to evaluate the safety of ranibizumab in subjects with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 116(9), pp.1731–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19643495> [Accessed November 3, 2013].
- Brancato, R. & Lumbroso, B., 2004. *Guide to optical coherence tomography interpretation* 1st ed., I.N.C.
- Brar, M. et al., 2009. Colour versus grey-scale display of images on high-resolution spectral OCT. *The British journal of ophthalmology*, 93(5), pp.597–602. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211609> [Accessed May 5, 2014].
- Braun, R.D. et al., 1996. Decreased deformability of polymorphonuclear leukocytes in diabetic cats. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 3(3), pp.271–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8930884> [Accessed March 30, 2014].
- Bresnick, G.H., 1983. Diabetic maculopathy. A critical review highlighting diffuse macular edema. *Ophthalmology*, 90(11), pp.1301–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6664669> [Accessed April 28, 2014].
- Bresnick, G.H. et al., 1984. Electroretinographic oscillatory potentials predict progression of diabetic retinopathy. Preliminary report. *Archives of ophthalmology*, 102(9), pp.1307–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6383303> [Accessed April 17, 2014].
- Bresnick, G.H. et al., 1985. Association of hue discrimination loss and diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology*, 103(9), pp.1317–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4038123> [Accessed April 17, 2014].
- Bresnick, G.H. et al., 2000. A screening approach to the surveillance of patients with diabetes for the presence of vision-threatening retinopathy. *Ophthalmology*, 107(1), pp.19–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647713> [Accessed June 14, 2014].
- Bressler, N.M. et al., 2008. Retinal thickness on Stratus optical coherence tomography in people with diabetes and minimal or no diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology*, 145(5), pp.894–901. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2408892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 2, 2014].
- Bressler, N.M. et al., 2012. Observational study of subclinical diabetic macular edema. *Eye (London, England)*, 26(6), pp.833–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3376297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2013].
- Bressler, S.B. et al., 2012. Factors associated with changes in visual acuity and central subfield thickness at 1 year after treatment for diabetic macular edema with ranibizumab. *Archives of ophthalmology*, 130(9), pp.1153–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3543147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 2, 2014].
- Bringmann, A. et al., 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*, 25(4), pp.397–424. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839797> [Accessed March 26, 2014].

- Bringmann, A. et al., 2009. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochemistry international*, 54(3-4), pp.143–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114072> [Accessed March 21, 2014].
- Bronson-Castain, K.W. et al., 2009. Adolescents with Type 2 diabetes: early indications of focal retinal neuropathy, retinal thinning, and venular dilation. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 29(5), pp.618–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2723847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 1, 2014].
- Brown, J.C. et al., 2004. Detection of diabetic foveal edema: contact lens biomicroscopy compared with optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology*, 122, pp.330–335.
- Brown, D.M. et al., 2013. Long-term outcomes of ranibizumab therapy for diabetic macular edema: the 36-month results from two phase III trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology*, 120(10), pp.2013–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706949> [Accessed May 12, 2014].
- Browning, D.J. et al., 2004. Comparison of the clinical diagnosis of diabetic macular edema with diagnosis by optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 111(4), pp.712–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051203> [Accessed April 28, 2014].
- Browning, D.J. & Fraser, C.M., 2005. Regional patterns of sight-threatening diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 140(1), pp.117–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15953575> [Accessed May 4, 2014].
- Browning, D.J. et al., 2007. Relationship between optical coherence tomography-measured central retinal thickness and visual acuity in diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 114, pp.525–536.
- Browning, D.J., Altaweel, M.M., et al., 2008. Diabetic macular edema: what is focal and what is diffuse? *American journal of ophthalmology*, 146(5), pp.649–55, 655.e1–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2785449&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 28, 2014].
- Browning, D.J., Glassman, A.R., et al., 2008. Optical coherence tomography measurements and analysis methods in optical coherence tomography studies of diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 115(8), pp.1366–71, 1371.e1. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2748270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 5, 2014].
- Browning, D.J. & Fraser, C.M., 2008. The predictive value of patient and eye characteristics on the course of subclinical diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 145(1), pp.149–154. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17997393> [Accessed May 1, 2014].
- Browning, D.J., Fraser, C.M. & Clark, S., 2008. The relationship of macular thickness to clinically graded diabetic retinopathy severity in eyes without clinically detected diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 115(3), pp.533–539.e2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18067962> [Accessed April 23, 2014].

- Browning, D.J., Fraser, C.M. & Propst, B.W., 2008. The variation in optical coherence tomography-measured macular thickness in diabetic eyes without clinical macular edema. *American journal of ophthalmology*, 145(5), pp.889–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329622> [Accessed April 30, 2014].
- Brownlee, M., Vlassara, H. & Cerami, A., 1984a. Inhibition of heparin-catalyzed human antithrombin III activity by nonenzymatic glycosylation. Possible role in fibrin deposition in diabetes. *Diabetes*, 33(6), pp.532–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6724150> [Accessed April 17, 2014].
- Brownlee, M., Vlassara, H. & Cerami, A., 1984b. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Annals of internal medicine*, 101(4), pp.527–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6383165> [Accessed April 17, 2014].
- Brownlee, M., 1994. Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*, 43(6), pp.836–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194672> [Accessed March 29, 2014].
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), pp.813–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742414> [Accessed January 27, 2014].
- Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6), pp.1615–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919781> [Accessed February 14, 2014].
- Bucolo, C. et al., 2009. Protective effects of a coumarin derivative in diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(8), pp.3846–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279317> [Accessed April 21, 2014].
- Bursell, S.E. et al., 1996. Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(5), pp.886–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603873> [Accessed June 15, 2014].
- Byeon, S.H. et al., 2009. Foveal ganglion cell layer damage in ischemic diabetic maculopathy: correlation of optical coherence tomographic and anatomic changes. *Ophthalmology*, 116(10), pp.1949–59.e8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699533> [Accessed November 2, 2013].
- Byeon, S.H. et al., 2012. New insights into the pathoanatomy of diabetic macular edema: angiographic patterns and optical coherence tomography. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 32(6), pp.1087–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481473> [Accessed April 29, 2014].
- Cabrera DeBuc, D. & Somfai, G.M., 2010. Early detection of retinal thickness changes in diabetes using Optical Coherence Tomography. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 16(3), pp.MT15–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190693> [Accessed May 15, 2014].

- Campochiaro, P.A. et al., 2011. Long-term benefit of sustained-delivery fluocinolone acetonide vitreous inserts for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 118(4), pp.626–635.e2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459216> [Accessed May 24, 2014].
- Carpineto, P. et al., 2010. Correlation in foveal thickness measurements between spectral-domain and time-domain optical coherence tomography in normal individuals. *Eye (London, England)*, 24(2), pp.251–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390564> [Accessed June 1, 2014].
- Catier, A. et al., 2005. Characterization of macular edema from various etiologies by optical coherence tomography. *American journal of ophthalmology*, 140(2), pp.200–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15992752> [Accessed May 6, 2014].
- Ceriello, A., 1993. Coagulation activation in diabetes mellitus: the role of hyperglycaemia and therapeutic prospects. *Diabetologia*, 36(11), pp.1119–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8270125> [Accessed March 29, 2014].
- Cervia, D. et al., 2012. Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin. *Journal of neurochemistry*, 120(5), pp.818–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22168912> [Accessed July 3, 2014].
- Chakravarthy, U. et al., 2012. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. *Ophthalmology*, 119(7), pp.1399–411. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22578446> [Accessed June 2, 2014].
- Chalam, K. V et al., 2012. Retinal thickness in people with diabetes and minimal or no diabetic retinopathy: Heidelberg Spectralis optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(13), pp.8154–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3522439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 3, 2014].
- Chan, A. & Duker, J.S., 2005. A standardized method for reporting changes in macular thickening using optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology*, 123(7), pp.939–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009835>.
- Chan, A. et al., 2006. Normal macular thickness measurements in healthy eyes using Stratus optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology*, 124(2), pp.193–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1941772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 1, 2014].
- Charonis, A.S. et al., 1990. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes*, 39(7), pp.807–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113013> [Accessed March 20, 2014].
- Cheema, H.R., Al Habash, A. & Al-Askar, E., 2014. Improvement of visual acuity based on optical coherence tomography patterns following intravitreal bevacizumab treatment in patients with diabetic macular edema. *International journal of ophthalmology*, 7(2), pp.251–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4003078&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 12, 2014].

- Cheung, N., Wang, J.J., et al., 2007. Diabetic retinopathy and the risk of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes care*, 30(7), pp.1742–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389333> [Accessed February 21, 2014].
- Cheung, N., Tikellis, G. & Wang, J.J., 2007. Diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, 114(11), pp.2098–9; author reply 2099. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980748> [Accessed February 13, 2014].
- Cheung, N. & Wong, T.Y., 2008. Diabetic retinopathy and systemic vascular complications. *Progress in retinal and eye research*, 27(2), pp.161–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249026> [Accessed February 23, 2014].
- Chew, E.Y. et al., 1996. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Archives of ophthalmology*, 114(9), pp.1079–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8790092> [Accessed April 14, 2014].
- Chew, E. et al., 2003. *Diabetic Retinopathy Preferred Practice Guidelines*, San Francisco: American Academy of Ophthalmology.
- Chew, E. et al., 2007. Randomized trial of peribulbar triamcinolone acetonide with and without focal photocoagulation for mild diabetic macular edema: a pilot study. *Ophthalmology*, 114(6), pp.1190–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2465806&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 5, 2014].
- Chew, E.Y. et al., 2010. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*, 363(3), pp.233–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4026164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 24, 2014].
- Choma, M. et al., 2003. Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography. *Optics express*, 11(18), pp.2183–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466106> [Accessed April 30, 2014].
- Clark, J.B. et al., 1994. Loss of vision before ophthalmic referral in blind and partially sighted diabetics in Bristol. *The British journal of ophthalmology*, 78(10), pp.741–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=504925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2014].
- Clermont, A.C. et al., 1997. Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology*, 124(4), pp.433–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9323935> [Accessed February 15, 2014].
- Clermont, A. et al., 2011. Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes*, 60(5), pp.1590–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3292335&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 2, 2014].

- Colosia, A.D., Palencia, R. & Khan, S., 2013. Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 6, pp.327–338. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3785394&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 23, 2014].
- Cruickshanks, K.J. et al., 1993. The association of microalbuminuria with diabetic retinopathy. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology*, 100(6), pp.862–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8510898> [Accessed February 23, 2014].
- Csaky, K.G., Richman, E.A. & Ferris, F.L., 2008. Report from the NEI/FDA Ophthalmic Clinical Trial Design and Endpoints Symposium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(2), pp.479–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234989> [Accessed May 12, 2014].
- Cui, J.Z. et al., 2007. Stage specificity of novel growth factor expression during development of proliferative vitreoretinopathy. *Eye (London, England)*, 21(2), pp.200–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531976> [Accessed February 15, 2014].
- Cukras, C. et al., 2010. Optical coherence tomography-based decision making in exudative age-related macular degeneration: comparison of time- vs spectral-domain devices. *Eye (London, England)*, 24(5), pp.775–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3016921&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 31, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G. & Maurice, D.M., 1967. The active transport of fluorescein by the retinal vessels and the retina. *The Journal of physiology*, 191(3), pp.467–86. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1365486&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 27, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G., 1972. Diabetic retinopathy. Human and experimental studies. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*, 92, pp.111–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4515503> [Accessed March 27, 2014].
- Cunha-Vaz, J., Faria de Abreu, J.R. & Campos, A.J., 1975. Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *The British journal of ophthalmology*, 59(11), pp.649–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1017427&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 8, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G., 1976. The blood-retinal barriers. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 41(2), pp.287–327. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1009819> [Accessed February 8, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G., Fonseca, J.R., Abreu, J.F., et al., 1978. A follow-up study by vitreous fluorophotometry of early retinal involvement in diabetes. *American journal of ophthalmology*, 86(4), pp.467–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/707592> [Accessed February 8, 2014].

- Cunha-Vaz, J.G., 1978. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology*, 62(6), pp.351–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1043233&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 8, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G., Fonseca, J.R. & Abreu, J.F., 1978. Vitreous fluorophotometry and retinal blood flow studies in proliferative retinopathy. *Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie. Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 207(2), pp.71–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/308782> [Accessed April 3, 2014].
- Cunha-Vaz, J., 1979. The blood-ocular barriers. *Survey of ophthalmology*, 23(5), pp.279–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/380030> [Accessed June 25, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G. et al., 1979. Early detection of retinal involvement in diabetes by vitreous fluorophotometry. *Ophthalmology*, 86(2), pp.264–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/530578> [Accessed June 15, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G. & Travassos, A., 1984. Breakdown of the blood-retinal barriers and cystoid macular edema. *Survey of ophthalmology*, 28 Suppl, pp.485–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6379947> [Accessed April 23, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G. et al., 1986. Effect of sorbinil on blood-retinal barrier in early diabetic retinopathy. *Diabetes*, 35(5), pp.574–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3514333> [Accessed April 27, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G., 1992. Perspectives in the treatment of diabetic retinopathy. *Diabetes/metabolism reviews*, 8(2), pp.105–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1425122> [Accessed March 16, 2014].
- Cunha-Vaz, J. et al., 1998. Progression of retinopathy and alteration of the blood-retinal barrier in patients with type 2 diabetes: a 7-year prospective follow-up study. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 236(4), pp.264–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9561358> [Accessed June 15, 2014].
- Cunha-Vaz, J.G., 2001. Initial alterations in nonproliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 215 Suppl, pp.7–13; discussion, 37–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11740159> [Accessed April 18, 2014].
- Cunha-Vaz, J. & Bernardes, R., 2005. Nonproliferative retinopathy in diabetes type 2. Initial stages and characterization of phenotypes. *Progress in retinal and eye research*, 24(3), pp.355–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15708833> [Accessed February 10, 2014].
- Cunha-Vaz, J., Bernardes, R. & Lobo, C., 2011. Blood-retinal barrier. *European journal of ophthalmology*, 21 Suppl 6, pp.S3–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264323> [Accessed February 10, 2014].

- Cunha-Vaz, J., Ribeiro, L. & Lobo, C., 2014. Phenotypes and biomarkers of diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*, 41C, pp.90–111. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24680929> [Accessed June 9, 2014].
- D'Amore, P.A., 1994. Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(12), pp.3974–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525506> [Accessed March 30, 2014].
- Daley, M.L., Watzke, R.C. & Riddle, M.C., 1987. Early loss of blue-sensitive color vision in patients with type I diabetes. *Diabetes care*, 10(6), pp.777–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3501362> [Accessed April 17, 2014].
- Danis, R.P. et al., 2006. Diurnal variation in retinal thickening measurement by optical coherence tomography in center-involved diabetic macular edema. *Archives of ophthalmology*, 124(12), pp.1701–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2279019&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 30, 2014].
- Davidov, E. et al., 2009. Diabetic retinopathy and health-related quality of life. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 247(2), pp.267–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18925408> [Accessed June 30, 2014].
- Davies, R., Sullivan, P. & Canning, C., 1996. Simulation of diabetic eye disease to compare screening policies. *The British journal of ophthalmology*, 80(11), pp.945–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=505668&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2014].
- Davis, M.D. et al., 2008. Comparison of time-domain OCT and fundus photographic assessments of retinal thickening in eyes with diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(5), pp.1745–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2408888&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 2, 2014].
- Dawson, D.W. et al., 1999. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5425), pp.245–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398599> [Accessed April 17, 2014].
- DCCT, 1987. Color photography vs fluorescein angiography in the detection of diabetic retinopathy in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Archives of ophthalmology*, 105(10), pp.1344–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3662904> [Accessed April 25, 2014].
- DCCT, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The New England journal of medicine*, 329, pp.977–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8366922>.
- DCCT, 1995a. Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Ophthalmology*, 102(4), pp.647–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7724182> [Accessed April 25, 2014].



- DCCT, 1995b. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*, 44(8), pp.968–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622004> [Accessed March 30, 2014].
- DCCT, 1996. Lifetime benefits and costs of intensive therapy as practiced in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 276(17), pp.1409–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892716> [Accessed April 25, 2014].
- DCCT, 2000. Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes care*, 23(8), pp.1084–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2631985&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
- Deák, G.G. et al., 2010. Effect of retinal photocoagulation on intraretinal lipid exudates in diabetic macular edema documented by optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 117(4), pp.773–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20079541> [Accessed May 5, 2014].
- Deb-Joardar, N. et al., 2005. Screening for diabetic retinopathy by ophthalmologists and endocrinologists with pupillary dilation and a nonmydriatic digital camera. *American journal of ophthalmology*, 140(5), pp.814–821. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310458> [Accessed June 14, 2014].
- Van Dijk, H.W. et al., 2009. Selective loss of inner retinal layer thickness in type 1 diabetic patients with minimal diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(7), pp.3404–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2937215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 15, 2014].
- Van Dijk, H.W. et al., 2010. Decreased retinal ganglion cell layer thickness in patients with type 1 diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(7), pp.3660–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130282> [Accessed May 2, 2014].
- Van Dijk, H.W. et al., 2012. Early neurodegeneration in the retina of type 2 diabetic patients. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(6), pp.2715–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3366721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 15, 2014].
- Ding, J. & Wong, T.Y., 2012. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Current diabetes reports*, 12(4), pp.346–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22585044> [Accessed April 28, 2014].
- Do, D. V et al., 2013. Ranibizumab for edema of the macula in diabetes study: 3-year outcomes and the need for prolonged frequent treatment. *JAMA ophthalmology*, 131(2), pp.139–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23544200> [Accessed May 24, 2014].

- Domalpally, A. et al., 2009. Quality issues in interpretation of optical coherence tomograms in macular diseases. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 29(6), pp.775–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373128> [Accessed April 30, 2014].
- Donnelly, R., Idris, I. & Forrester, J. V., 2004. Protein kinase C inhibition and diabetic retinopathy: a shot in the dark at translational research. *The British journal of ophthalmology*, 88(1), pp.145–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1771919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 18, 2014].
- Drexler, W. & Fujimoto, J.G., 2008. State-of-the-art retinal optical coherence tomography. *Progress in retinal and eye research*, 27(1), pp.45–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18036865> [Accessed April 28, 2014].
- DRS, 1976. Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *American journal of ophthalmology*, 81(4), pp.383–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/944535> [Accessed April 25, 2014].
- DRS, 1981a. Diabetic retinopathy study. Report Number 6. Design, methods, and baseline results. Report Number 7. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. Prepared by the Diabetic Retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 21(1 Pt 2), pp.1–226. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7195893> [Accessed January 9, 2014].
- DRS, 1981b. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS Report Number 8. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*, 88(7), pp.583–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7196564> [Accessed February 4, 2014].
- DRVS, 1985. Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Two-year results of a randomized trial. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study report 2. The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group. *Archives of ophthalmology*, 103(11), pp.1644–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2865943> [Accessed April 25, 2014].
- DRVS, 1988. Early vitrectomy for severe proliferative diabetic retinopathy in eyes with useful vision. Clinical application of results of a randomized trial—Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Report 4. The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group. *Ophthalmology*, 95(10), pp.1321–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2465518> [Accessed April 25, 2014].
- DRVS, 1990. Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Four-year results of a randomized trial: Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Report 5. *Archives of ophthalmology*, 108(7), pp.958–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2196036> [Accessed April 25, 2014].
- Du, X.L. et al., 2000. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), pp.12222–6. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=17322&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 20, 2014].

Du, X. et al., 2003. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 112(7), pp.1049–57. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=198524&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 23, 2014].

Duker, J.S. et al., 2013. The International Vitreomacular Traction Study Group classification of vitreomacular adhesion, traction, and macular hole. *Ophthalmology*, 120(12), pp.2611–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053995> [Accessed May 23, 2014].

Eandi, C.M. et al., 2005. Optical coherence tomography in unilateral resolved central serous chorioretinopathy. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 25(4), pp.417–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15933586> [Accessed May 6, 2014].

Elman, M.J. et al., 2010. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 117(6), pp.1064–1077.e35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2937272&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 12, 2014].

Elman, M.J. et al., 2011. Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 118(4), pp.609–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3096445&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 2, 2014].

Elman, M.J. et al., 2012. Intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema with prompt versus deferred laser treatment: three-year randomized trial results. *Ophthalmology*, 119(11), pp.2312–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3490003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 7, 2014].

Emanuele, N., Klein, R., et al., 2009. Comparison of dilated fundus examinations with seven-field stereo fundus photographs in the Veterans Affairs Diabetes Trial. *Journal of diabetes and its complications*, 23(5), pp.323–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406632> [Accessed April 25, 2014].

Emanuele, N., Moritz, T., et al., 2009. Ethnicity, race, and clinically significant macular edema in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). *Diabetes research and clinical practice*, 86(2), pp.104–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19720420> [Accessed April 29, 2014].

Enge, M. et al., 2002. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *The EMBO journal*, 21(16), pp.4307–16. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126162&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 7, 2014].

- Engerman, R.L. & Kern, T.S., 1984. Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. *Diabetes*, 33(1), pp.97–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6360771> [Accessed April 17, 2014].
- Engler, C., Krogsaa, B. & Lund-Andersen, H., 1991. Blood-retina barrier permeability and its relation to the progression of diabetic retinopathy in type 1 diabetics. An 8-year follow-up study. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 229(5), pp.442–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1937077> [Accessed June 15, 2014].
- Eriksson, U. & Alm, A., 2009. Macular thickness decreases with age in normal eyes: a study on the macular thickness map protocol in the Stratus OCT. *The British journal of ophthalmology*, 93(11), pp.1448–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019921> [Accessed May 1, 2014].
- Esmaeelpour, M. et al., 2011. Mapping choroidal and retinal thickness variation in type 2 diabetes using three-dimensional 1060-nm optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(8), pp.5311–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508108> [Accessed May 18, 2014].
- Esser, S. et al., 1998. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *The Journal of cell biology*, 140(4), pp.947–59. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2141756&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 18, 2014].
- ETDRS, 1985. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Archives of ophthalmology*, 103, pp.1796–1806. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=2866759&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- ETDRS, 1987. Treatment techniques and clinical guidelines for photocoagulation of diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 2. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*, 94(7), pp.761–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3658348> [Accessed April 25, 2014].
- ETDRS, 1991a. Classification of diabetic retinopathy from fluorescein angiograms. ETDRS report number 11. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*, 98(5 Suppl), pp.807–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062514> [Accessed April 25, 2014].
- ETDRS, 1991b. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*, 98(5 Suppl), pp.766–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062512> [Accessed March 6, 2014].
- ETDRS, 1991c. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study design and baseline patient characteristics. ETDRS report number 7. *Ophthalmology*, 98(5 Suppl), pp.741–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062510> [Accessed April 25, 2014].

- ETDRS, 1991d. Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*, 98(5 Suppl), pp.823–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062515> [Accessed March 16, 2014].
- ETDRS, 1991e. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*, 98(5 Suppl), pp.786–806. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062513> [Accessed February 23, 2014].
- Farley, T.F. et al., 2008. Accuracy of primary care clinicians in screening for diabetic retinopathy using single-image retinal photography. *Annals of family medicine*, 6(5), pp.428–34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2532778&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2014].
- Feenstra, D.J., Yego, E.C. & Mohr, S., 2013. Modes of Retinal Cell Death in Diabetic Retinopathy. *Journal of clinical & experimental ophthalmology*, 4(5), p.298. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24672740> [Accessed March 29, 2014].
- Felinski, E.A. et al., 2008. Glucocorticoids induce transactivation of tight junction genes occludin and claudin-5 in retinal endothelial cells via a novel cis-element. *Experimental eye research*, 86(6), pp.867–78. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2613867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 8, 2014].
- Feng, D. et al., 1997. Reinterpretation of endothelial cell gaps induced by vasoactive mediators in guinea-pig, mouse and rat: many are transcellular pores. *The Journal of physiology*, 504 ( Pt 3, pp.747–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1159976&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 15, 2014].
- Feng, Y. et al., 1999. VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(1), pp.157–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9888439> [Accessed February 15, 2014].
- Ferrara, N. et al., 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine reviews*, 13(1), pp.18–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372863> [Accessed March 30, 2014].
- Ferris, F.L. & Patz, A., 1984. Macular edema. A complication of diabetic retinopathy. *Survey of ophthalmology*, 28 Suppl, pp.452–461.
- Fine, B.S. & Brucker, A.J., 1981. Macular edema and cystoid macular edema. *Am J Ophthalmol*, 92, pp.466–481. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7294109](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7294109) .
- Flaxel, C.J. et al., 2010. Factors associated with visual acuity outcomes after vitrectomy for diabetic macular edema: diabetic retinopathy clinical research network. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 30(9), pp.1488–95. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2975977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 6, 2014].
- Fletcher, E.L. et al., 2007. Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy. *Current pharmaceutical design*, 13(26), pp.2699–712. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897014> [Accessed March 29, 2014].
- Fong, D.S. et al., 1997. Subretinal fibrosis in diabetic macular edema. ETDRS report 23. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Archives of ophthalmology*, 115(7), pp.873–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230827> [Accessed May 15, 2014].
- Fong, D.S. et al., 2007. Comparison of the modified Early Treatment Diabetic Retinopathy Study and mild macular grid laser photocoagulation strategies for diabetic macular edema. *Archives of ophthalmology*, 125(4), pp.469–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2536574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 23, 2014].
- Fong, D.S. & Contreras, R., 2009. Glitazone use associated with diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 147(4), pp.583–586.e1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181303> [Accessed April 29, 2014].
- Forooghian, F. et al., 2008. Evaluation of time domain and spectral domain optical coherence tomography in the measurement of diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(10), pp.4290–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2574838&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 30, 2014].
- Forooghian, F. et al., 2010. Relationship between photoreceptor outer segment length and visual acuity in diabetic macular edema. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 30(1), pp.63–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3021331&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 5, 2014].
- Forte, R. et al., 2009. Comparison of time domain Stratus OCT and spectral domain SLO/OCT for assessment of macular thickness and volume. *Eye (London, England)*, 23(11), pp.2071–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079147> [Accessed May 3, 2014].
- Fortune, B., Schneck, M.E. & Adams, A.J., 1999. Multifocal electroretinogram delays reveal local retinal dysfunction in early diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(11), pp.2638–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10509661> [Accessed April 17, 2014].
- Frisén, L. & Frisén, M., 1976. A simple relationship between the probability distribution of visual acuity and the density of retinal output channels. *Acta ophthalmologica*, 54(4), pp.437–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/989239> [Accessed April 16, 2014].
- Funatsu, H. et al., 2006. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 113(2),

- pp.294–301. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406543> [Accessed April 27, 2014].
- Gabrielian, A. et al., 2010. The utility of visual function questionnaire in the assessment of the impact of diabetic retinopathy on vision-related quality of life. *Eye (London, England)*, 24(1), pp.29–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325572> [Accessed June 30, 2014].
- Gaede, P. et al., 2008. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*, 358(6), pp.580–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256393> [Accessed February 8, 2014].
- Gardete-Correia, L. et al., 2010. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 27(8), pp.879–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20653744> [Accessed February 13, 2014].
- Gardiner, T.A. et al., 2007. Arteriolar involvement in the microvascular lesions of diabetic retinopathy: implications for pathogenesis. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 14(1), pp.25–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17365659> [Accessed February 8, 2014].
- Gardner, T.W. et al., 1997. Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 38(11), pp.2423–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9344364> [Accessed May 20, 2014].
- Gardner, T.W. et al., 2000. New insights into the pathophysiology of diabetic retinopathy: potential cell-specific therapeutic targets. *Diabetes technology & therapeutics*, 2(4), pp.601–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469624> [Accessed April 18, 2014].
- Gardner, T.W. et al., 2002. Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Survey of ophthalmology*, 47 Suppl 2, pp.S253–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507627> [Accessed April 24, 2014].
- Gaucher, D. et al., 2005. Optical coherence tomography assessment of the vitreoretinal relationship in diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 139(5), pp.807–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15860284> [Accessed May 6, 2014].
- Gaucher, D. et al., 2008. Optical coherence tomography features during the evolution of serous retinal detachment in patients with diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 145(2), pp.289–296. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054885> [Accessed May 6, 2014].
- Van Geest, R.J. et al., 2010. Differential TGF- $\beta$  signaling in retinal vascular cells: a role in diabetic retinopathy? *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(4), pp.1857–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19959647> [Accessed February 15, 2014].

- Ghazi, N.G. et al., 2007. Optical coherence tomography findings in persistent diabetic macular edema: the vitreomacular interface. *American journal of ophthalmology*, 144(5), pp.747–754. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17869207> [Accessed April 29, 2014].
- Giammaria, D. et al., 2011. Comparison of macular thickness measurements between time-domain and spectral-domain optical coherence tomographies in eyes with and without macular abnormalities. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31(4), pp.707–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21836402> [Accessed June 7, 2014].
- Giardino, I., Edelstein, D. & Brownlee, M., 1994. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 94(1), pp.110–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=296288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 20, 2014].
- Gilbert, R.E. et al., 1998. Early nephropathy predicts vision-threatening retinal disease in patients with type I diabetes mellitus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 9(1), pp.85–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9440091> [Accessed April 29, 2014].
- Goatman, K. et al., 2011. Assessment of automated disease detection in diabetic retinopathy screening using two-field photography. *PLoS one*, 6(12), p.e27524. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3234241&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 3, 2014].
- Goebel, W. & Kretzchmar-Gross, T., 2002. Retinal thickness in diabetic retinopathy: a study using optical coherence tomography (OCT). *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 22, pp.759–767.
- Goebel, W. & Franke, R., 2006. Retinal thickness in diabetic retinopathy: comparison of optical coherence tomography, the retinal thickness analyzer, and fundus photography. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 26(1), pp.49–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16395139> [Accessed May 7, 2014].
- Gonzalez, M.E. et al., 1995. Concordance in diagnosis of diabetic retinopathy by fundus photography between retina specialists and a standardized reading center. Mexico City Diabetes Study Retinopathy Group. *Archives of medical research*, 26(2), pp.127–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7620277> [Accessed April 25, 2014].
- Gowda, K., Zinnanti, W.J. & LaNoue, K.F., 2011. The influence of diabetes on glutamate metabolism in retinas. *Journal of neurochemistry*, 117(2), pp.309–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288239> [Accessed July 5, 2014].
- Grassi, M.A. et al., 2012. Replication analysis for severe diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(4), pp.2377–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3777289&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 21, 2014].
- Green, F.D. et al., 1985. Colour vision of diabetics. *The British journal of ophthalmology*, 69(7), pp.533–6. Available at:



<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1040663&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 17, 2014].

Grover, S. et al., 2009. Normative data for macular thickness by high-definition spectral-domain optical coherence tomography (spectralis). *American journal of ophthalmology*, 148(2), pp.266–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427616> [Accessed May 2, 2014].

Grover, S. et al., 2010. Comparison of retinal thickness in normal eyes using Stratus and Spectralis optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(5), pp.2644–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007831> [Accessed November 3, 2013].

Grunwald, J.E., DuPont, J. & Riva, C.E., 1996. Retinal haemodynamics in patients with early diabetes mellitus. *The British journal of ophthalmology*, 80(4), pp.327–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=505459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 16, 2014].

Guan, K., Hudson, C. & Flanagan, J.G., 2004. Comparison of Heidelberg Retina Tomograph II and Retinal Thickness Analyzer in the assessment of diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(2), pp.610–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744905> [Accessed May 7, 2014].

Guedes, V. et al., 2003. Optical coherence tomography measurement of macular and nerve fiber layer thickness in normal and glaucomatous human eyes. *Ophthalmology*, 110(1), pp.177–89. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1949047&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 1, 2014].

Gupta, A. et al., 2004. Lipid-lowering drug atorvastatin as an adjunct in the management of diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 137(4), pp.675–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059707> [Accessed April 29, 2014].

Haefliger, I.O. et al., 1994. The vascular endothelium as a regulator of the ocular circulation: a new concept in ophthalmology? *Survey of ophthalmology*, 39(2), pp.123–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7801220> [Accessed April 29, 2014].

Haffner, S.M. et al., 1988. Diabetic retinopathy in Mexican Americans and non-Hispanic whites. *Diabetes*, 37(7), pp.878–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3384186> [Accessed February 20, 2014].

Haller, J.A. et al., 2010. Vitrectomy outcomes in eyes with diabetic macular edema and vitreomacular traction. *Ophthalmology*, 117(6), pp.1087–1093.e3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2911350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 6, 2014].

Hamman, R.F. et al., 1989. Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in non-Hispanic whites and Hispanics with NIDDM. San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes*, 38(10), pp.1231–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2792575> [Accessed February 20, 2014].

- Hamman, R.F. et al., 1991. Microvascular complications of NIDDM in Hispanics and non-Hispanic whites. San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes care*, 14(7), pp.655–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1914815> [Accessed February 20, 2014].
- Hammes, H.P., Federoff, H.J. & Brownlee, M., 1995. Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 1(5), pp.527–34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2229962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 21, 2014].
- Hammes, H.P. et al., 1998. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes*, 47(3), pp.401–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519746> [Accessed February 15, 2014].
- Hammes, H.-P. et al., 2011. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression. *Diabetes*, 60(1), pp.9–16. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3012202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 29, 2014].
- Han, Y., Schneck, M.E., et al., 2004. Formulation and evaluation of a predictive model to identify the sites of future diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(11), pp.4106–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15505062> [Accessed June 25, 2014].
- Han, Y., Adams, A.J., et al., 2004. Multifocal electroretinogram and short-wavelength automated perimetry measures in diabetic eyes with little or no retinopathy. *Archives of ophthalmology*, 122(12), pp.1809–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596584> [Accessed April 17, 2014].
- Han, Y., Bearse, M.A., et al., 2004. Multifocal electroretinogram delays predict sites of subsequent diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(3), pp.948–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985316> [Accessed April 17, 2014].
- Han, I.C. & Jaffe, G.J., 2009. Comparison of spectral- and time-domain optical coherence tomography for retinal thickness measurements in healthy and diseased eyes. *American journal of ophthalmology*, 147(5), pp.847–58, 858.e1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200530> [Accessed May 1, 2014].
- Harbour, J.W. et al., 1996. Vitrectomy for diabetic macular edema associated with a thickened and taut posterior hyaloid membrane. *American journal of ophthalmology*, 121, pp.405–413.
- Harding, S.P. et al., 1995. Sensitivity and specificity of photography and direct ophthalmoscopy in screening for sight threatening eye disease: the Liverpool Diabetic Eye Study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 311(7013), pp.1131–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2551056&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 28, 2014].

- Harhaj, N.S., Barber, A.J. & Antonetti, D.A., 2002. Platelet-derived growth factor mediates tight junction redistribution and increases permeability in MDCK cells. *Journal of cellular physiology*, 193(3), pp.349–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384987> [Accessed April 21, 2014].
- Harhaj, N.S. & Antonetti, D.A., 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(7), pp.1206–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109567> [Accessed April 10, 2014].
- Harhaj, N.S. et al., 2006. VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(11), pp.5106–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17065532> [Accessed July 16, 2014].
- Hariprasad, S.M. et al., 2008. Vision-related quality of life in patients with diabetic macular oedema. *The British journal of ophthalmology*, 92(1), pp.89–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17584999> [Accessed June 28, 2014].
- Haritoglou, C. et al., 2014. Microaneurysm formation rate as a predictive marker for progression to clinically significant macular edema in nonproliferative diabetic retinopathy. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 34(1), pp.157–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792485> [Accessed June 15, 2014].
- Harris, M.I. et al., 1992. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis. *Diabetes care*, 15(7), pp.815–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1516497> [Accessed February 4, 2014].
- Harris, M.I. & Eastman, R.C., 2000. Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 16(4), pp.230–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934451> [Accessed February 20, 2014].
- Harrison, W.W. et al., 2011. Prediction, by retinal location, of the onset of diabetic edema in patients with nonproliferative diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(9), pp.6825–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3176012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 25, 2014].
- Hayashi, H. et al., 2009. Association between foveal photoreceptor integrity and visual outcome in neovascular age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*, 148, pp.83–89.e1.
- Hee, M.R., Izatt, J.A., et al., 1995. Optical coherence tomography of the human retina. *Archives of ophthalmology*, 113(3), pp.325–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7887846> [Accessed April 30, 2014].
- Hee, M.R., Puliafito, C.A., et al., 1995. Quantitative assessment of macular edema with optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology*, 113(8), pp.1019–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7639652> [Accessed April 30, 2014].
- Hee, M.R. et al., 1998. Topography of diabetic macular edema with optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 105(2), pp.360–70. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2923575&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 2, 2014].
- Heilig, C.W. et al., 1995. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *The Journal of clinical investigation*, 96(4), pp.1802–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=185817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 20, 2014].
- Helmy, Y.M. & Atta Allah, H.R., 2013. Optical coherence tomography classification of diabetic cystoid macular edema. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 7, pp.1731–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3770711&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 12, 2014].
- Hietala, K. et al., 2008. Heritability of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*, 57(8), pp.2176–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2494680&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 21, 2014].
- Hikichi, T. et al., 1997. Association between the short-term natural history of diabetic macular edema and the vitreomacular relationship in type II diabetes mellitus. *Ophthalmology*, 104(3), pp.473–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082275> [Accessed May 5, 2014].
- Hinton, D.R. et al., 2002. Novel growth factors involved in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. *Eye (London, England)*, 16(4), pp.422–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12101449> [Accessed February 15, 2014].
- Hirai, F.E. et al., 2011. Ten-year change in vision-related quality of life in type 1 diabetes: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, 118(2), pp.353–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3017211&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 6, 2014].
- Hirsch, I.B. & Brownlee, M., 2010. Beyond hemoglobin A1c--need for additional markers of risk for diabetic microvascular complications. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 303(22), pp.2291–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530784> [Accessed May 31, 2014].
- Ho, J. et al., 2009. Assessment of artifacts and reproducibility across spectral- and time-domain optical coherence tomography devices. *Ophthalmology*, 116(10), pp.1960–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2757525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 30, 2014].
- Holman, R.R. et al., 2008. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*, 359(15), pp.1577–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784090> [Accessed February 21, 2014].
- Holz, F.G. et al., 2011. Safety and efficacy of a flexible dosing regimen of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: the SUSTAIN study. *Ophthalmology*,

- 118(4), pp.663–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459217> [Accessed May 31, 2014].
- Hood, D.C. et al., 2002. Retinal origins of the primate multifocal ERG: implications for the human response. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(5), pp.1673–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980890> [Accessed July 6, 2014].
- Horii, T. et al., 2010. Optical coherence tomographic characteristics of microaneurysms in diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology*, 150(6), pp.840–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20855054> [Accessed November 4, 2013].
- Hovind, P. et al., 2003. Decreasing incidence of severe diabetic microangiopathy in type 1 diabetes. *Diabetes care*, 26(4), pp.1258–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663607> [Accessed July 8, 2014].
- Huang, D. et al., 1991. Optical Coherence Tomography. *Science*, 254, pp.1178–81. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>.
- Humphrey, A.R. et al., 1996. Diabetes and nontraumatic lower extremity amputations. Incidence, risk factors, and prevention--a 12-year follow-up study in Nauru. *Diabetes care*, 19(7), pp.710–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8799624> [Accessed February 21, 2014].
- Ibrahim, A.S. et al., 2011. Retinal microglial activation and inflammation induced by amadori-glycated albumin in a rat model of diabetes. *Diabetes*, 60(4), pp.1122–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3064086&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 15, 2014].
- Ibrahim, M.A. et al., 2012. Spectral- and time-domain optical coherence tomography measurements of macular thickness in normal eyes and in eyes with diabetic macular edema. *Eye (London, England)*, 26(3), pp.454–62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3298977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 5, 2014].
- Idris, I., Warren, G. & Donnelly, R., 2012. Association between thiazolidinedione treatment and risk of macular edema among patients with type 2 diabetes. *Archives of internal medicine*, 172(13), pp.1005–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688528> [Accessed April 29, 2014].
- Ikeda, T. et al., 1999a. Attached posterior hyaloid membrane and the pathogenesis of honeycombed cystoid macular edema in patients with diabetes. *American journal of ophthalmology*, 127(4), pp.478–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10218713> [Accessed April 28, 2014].
- Ikeda, T. et al., 1999b. Vitrectomy for cystoid macular oedema with attached posterior hyaloid membrane in patients with diabetes. *The British journal of ophthalmology*, 83(1), pp.12–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1722776&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 28, 2014].

## Referências

- Ishida, S. et al., 2003. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(5), pp.2155–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12714656> [Accessed April 27, 2014].
- Ishii, H. et al., 1996. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5262), pp.728–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8614835> [Accessed March 20, 2014].
- James, M. et al., 2000. Cost effectiveness analysis of screening for sight threatening diabetic eye disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 320(7250), pp.1627–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27406&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2014].
- Javitt, J.C. et al., 1994. Preventive eye care in people with diabetes is cost-saving to the federal government. Implications for health-care reform. *Diabetes care*, 17(8), pp.909–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7956643> [Accessed February 23, 2014].
- Javitt, J.C. & Aiello, L.P., 1996. Cost-effectiveness of detecting and treating diabetic retinopathy. *Annals of internal medicine*, 124(1 Pt 2), pp.164–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8554212> [Accessed February 23, 2014].
- Jekel JF, Elmore JG & Katz DL, 1996. Epidemiology, Biostatistics, and Preventive Medicine. In Philadelphia: WB Saunders, pp. 216–217.
- Joussen, A.M. et al., 2001. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *The American journal of pathology*, 158(1), pp.147–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1850259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 15, 2014].
- Joussen, A.M. et al., 2002. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *The American journal of pathology*, 160(2), pp.501–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1850650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 15, 2014].
- Joussen, A.M. et al., 2004. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(12), pp.1450–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231732> [Accessed June 23, 2014].
- Joussen, A.M., Smyth, N. & Niessen, C., 2007. Pathophysiology of diabetic macular edema. *Developments in ophthalmology*, 39, pp.1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245075> [Accessed April 28, 2014].
- Joussen, A.M. et al., 2009. TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Molecular vision*, 15, pp.1418–28. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2716944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 19, 2014].

- Kaiser, N. et al., 1993. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes*, 42(1), pp.80–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678404> [Accessed March 20, 2014].
- Kaiser, P.K. et al., 2001. Macular traction detachment and diabetic macular edema associated with posterior hyaloidal traction. *American journal of ophthalmology*, 131(1), pp.44–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11162978> [Accessed May 6, 2014].
- Kaiser, P.K., 2006. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *American journal of ophthalmology*, 142(4), pp.660–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17011860> [Accessed July 16, 2014].
- Kakinoki, M. et al., 2009. Comparison of macular thickness between Cirrus HD-OCT and Stratus OCT. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye*, 40(2), pp.135–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320302> [Accessed June 5, 2014].
- Kakinoki, M. et al., 2012. Comparison of macular thickness in diabetic macular edema using spectral-domain optical coherence tomography and time-domain optical coherence tomography. *Journal of ophthalmology*, 2012, p.959721. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3270434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 1, 2014].
- Kang, S.W., Park, C.Y. & Ham, D.-I., 2004. The correlation between fluorescein angiographic and optical coherence tomographic features in clinically significant diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 137, pp.313–322.
- Kashani, A.H. et al., 2010. Retinal thickness analysis by race, gender, and age using Stratus OCT. *American journal of ophthalmology*, 149(3), pp.496–502.e1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042179> [Accessed May 2, 2014].
- Kawasaki, R. et al., 2011. Is diabetic retinopathy related to subclinical cardiovascular disease? *Ophthalmology*, 118(5), pp.860–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3087839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 21, 2014].
- Kelty, P.J. et al., 2008. Macular thickness assessment in healthy eyes based on ethnicity using Stratus OCT optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(6), pp.2668–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515595> [Accessed May 1, 2014].
- Kempner, J.H. et al., 2004. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Archives of ophthalmology*, 122(4), pp.552–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078674> [Accessed February 22, 2014].
- Kennedy, L. & Baynes, J.W., 1984. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia*, 26(2), pp.93–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6370764> [Accessed April 17, 2014].

## Referências

- Kern, T.S. & Engerman, R.L., 1994. Comparison of retinal lesions in alloxan-diabetic rats and galactose-fed rats. *Current eye research*, 13(12), pp.863–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7720392> [Accessed March 27, 2014].
- Kern, T.S. & Engerman, R.L., 1996. A mouse model of diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology*, 114(8), pp.986–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8694735> [Accessed April 17, 2014].
- Kern, T.S., 2007. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research*, 2007, p.95103. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2216058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 30, 2014].
- Kiire, C.A., Porta, M. & Chong, V., 2013. Medical management for the prevention and treatment of diabetic macular edema. *Survey of ophthalmology*, 58(5), pp.459–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23969020> [Accessed July 8, 2014].
- Kim, B.Y., Smith, S.D. & Kaiser, P.K., 2006. Optical coherence tomographic patterns of diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 142(3), pp.405–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16935584> [Accessed November 29, 2013].
- Kim, M. et al., 2011. Effect of intravitreal bevacizumab based on optical coherence tomography patterns of diabetic macular edema. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 226(3), pp.138–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822008> [Accessed May 12, 2014].
- Kim, N.R. et al., 2009. Optical coherence tomographic patterns in diabetic macular oedema: prediction of visual outcome after focal laser photocoagulation. *The British journal of ophthalmology*, 93(7), pp.901–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254904> [Accessed May 6, 2014].
- Kim, S.Y. et al., 2005. Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas. *Diabetes*, 54(5), pp.1534–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855343> [Accessed March 30, 2014].
- King, G.L. et al., 1994. Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. *Annual review of medicine*, 45, pp.179–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8198375> [Accessed February 14, 2014].
- King, G.L. & Brownlee, M., 1996. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 25(2), pp.255–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8799700> [Accessed March 27, 2014].
- Kinyoun, J. et al., 1989. Detection of diabetic macular edema. Ophthalmoscopy versus photography--Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 5. The ETDRS Research Group. *Ophthalmology*, 96(6), pp.746–50; discussion 750–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2740076> [Accessed April 25, 2014].



- Kiri, A. et al., 1996. Detection of diabetic macular edema: Nidek 3Dx stereophotography compared with fundus biomicroscopy. *American journal of ophthalmology*, 122, pp.654–662.
- Klaassen, I. et al., 2009. Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Experimental eye research*, 89(1), pp.4–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19284967> [Accessed April 21, 2014].
- Klaassen, I., Van Noorden, C.J.F. & Schlingemann, R.O., 2013. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Progress in retinal and eye research*, 34, pp.19–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416119> [Accessed January 20, 2014].
- Klein, R. et al., 1984a. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Archives of ophthalmology*, 102(4), pp.520–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6367724> [Accessed January 30, 2014].
- Klein, R. et al., 1984b. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Archives of ophthalmology*, 102(4), pp.527–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6367725> [Accessed January 30, 2014].
- Klein, R. et al., 1984c. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV. Diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 91(12), pp.1464–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6521986> [Accessed February 23, 2014].
- Klein, R. et al., 1985. Diabetic retinopathy as detected using ophthalmoscopy, a nonmydriatic camera and a standard fundus camera. *Ophthalmology*, 92(4), pp.485–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4000642> [Accessed June 14, 2014].
- Klein, B.E. et al., 1991. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate. *Ophthalmology*, 98(8), pp.1261–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1923364> [Accessed February 23, 2014].
- Klein, R. et al., 1992. The Beaver Dam Eye Study. Retinopathy in adults with newly discovered and previously diagnosed diabetes mellitus. *Ophthalmology*, 99(1), pp.58–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1741141> [Accessed April 23, 2014].
- Klein, R. et al., 1994. Relationship of hyperglycemia to the long-term incidence and progression of diabetic retinopathy. *Archives of internal medicine*, 154(19), pp.2169–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7944837> [Accessed February 23, 2014].
- Klein, R., Meuer, S.M., et al., 1995. Retinal microaneurysm counts and 10-year progression of diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology*, 113(11), pp.1386–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7487599> [Accessed March 16, 2014].
- Klein, R., Klein, B.E.K., et al., 1995. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy XV: The long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology*, 102, pp.7–16.

- Klein, R., 1997. Barriers to prevention of vision loss caused by diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology*, 115(8), pp.1073–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9258233> [Accessed June 29, 2014].
- Klein, R. et al., 1998. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology*, 105(10), pp.1801–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9787347> [Accessed February 23, 2014].
- Klein, R. et al., 2002. The association of atherosclerosis, vascular risk factors, and retinopathy in adults with diabetes : the atherosclerosis risk in communities study. *Ophthalmology*, 109(7), pp.1225–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093643> [Accessed April 29, 2014].
- Klein, B. & Klein, R.E., 2003. Diabetic Retinopathy. In G. Johnson et al., eds. *The Epidemiology of Eye Disease*. Oxford University Press, pp. 341–355.
- Klein, B.E.K. et al., 2004. Cardiovascular disease, mortality, and retinal microvascular characteristics in type 1 diabetes: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Archives of internal medicine*, 164(17), pp.1917–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451768> [Accessed February 23, 2014].
- Klein, R. et al., 2009. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXIII: the twenty-five-year incidence of macular edema in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology*, 116(3), pp.497–503. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2693093&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 21, 2014].
- Klein, R. et al., 2010. The 25-year incidence of visual impairment in type 1 diabetes mellitus the wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, 117(1), pp.63–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2814955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 21, 2014].
- Klein, R. & Klein, B.E.K., 2010. Are individuals with diabetes seeing better?: a long-term epidemiological perspective. *Diabetes*, 59(8), pp.1853–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2911057&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 8, 2014].
- Kleinstein, R.N. et al., 1987. Detection of diabetic retinopathy by optometrists. *Journal of the American Optometric Association*, 58(11), pp.879–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3693777> [Accessed June 14, 2014].
- Kohner, E.M. & Henkind, P., 1970. Correlation of fluorescein angiogram and retinal digest in diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology*, 69(3), pp.403–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4907465> [Accessed March 30, 2014].
- Kohner, E.M. et al., 1975. The retinal blood flow in diabetes. *Diabetologia*, 11(1), pp.27–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1140516> [Accessed April 3, 2014].
- Kohner, E.M. et al., 1998. United Kingdom Prospective Diabetes Study, 30: diabetic retinopathy at diagnosis of non-insulin-dependent diabetes mellitus and associated risk factors.

- Archives of ophthalmology*, 116(3), pp.297–303. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9514482> [Accessed April 25, 2014].
- Koleva-Georgieva, D.N. & Sivkova, N.P., 2008. Types of diabetic macular edema assessed by optical coherence tomography. *Folia medica*, 50(3), pp.30–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19009748> [Accessed May 12, 2014].
- Kolm-Litty, V. et al., 1998. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *The Journal of clinical investigation*, 101(1), pp.160–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=508552&tool=pmcentrez&endertype=abstract> [Accessed March 20, 2014].
- Konno, S., Akiba, J. & Yoshida, A., 2001. Retinal thickness measurements with optical coherence tomography and the scanning retinal thickness analyzer. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 21(1), pp.57–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11217931> [Accessed May 5, 2014].
- Koozekanani, D. et al., 2000. Intersession repeatability of macular thickness measurements with the Humphrey 2000 OCT. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(6), pp.1486–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10798667> [Accessed May 5, 2014].
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. & Starkov, A.A., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters*, 416(1), pp.15–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369223> [Accessed March 23, 2014].
- Koya, D. & King, G.L., 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47(6), pp.859–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9604860> [Accessed March 20, 2014].
- Koya, D. et al., 2000. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(3), pp.439–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698958> [Accessed March 20, 2014].
- Koytak, A. et al., 2013. Effect of a single intravitreal bevacizumab injection on different optical coherence tomographic patterns of diabetic macular oedema. *Eye (London, England)*, 27(6), pp.716–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470789> [Accessed May 12, 2014].
- Krebs, I. et al., 2009. Quality of the threshold algorithm in age-related macular degeneration: Stratus versus Cirrus OCT. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(3), pp.995–1000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029035> [Accessed April 30, 2014].
- Kristinsson, J.K., Gottfredsdóttir, M.S. & Stefánsson, E., 1997. Retinal vessel dilatation and elongation precedes diabetic macular oedema. *The British journal of ophthalmology*, 81(4), pp.274–8. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1722148&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 11, 2014].

Krogsaa, B. et al., 1987. Blood-retinal barrier permeability versus diabetes duration and retinal morphology in insulin dependent diabetic patients. *Acta ophthalmologica*, 65(6), pp.686–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3434234> [Accessed March 16, 2014].

Krzystolik, M.G. et al., 2007. Reproducibility of macular thickness and volume using Zeiss optical coherence tomography in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 114(8), pp.1520–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2253719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].

Kuo, H.-K., Hsieh, H.-H. & Liu, R.-T., 2005. Screening for diabetic retinopathy by one-field, non-mydratic, 45 degrees digital photography is inadequate. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 219(5), pp.292–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123556> [Accessed June 14, 2014].

Kusari, J. et al., 2007. Effect of memantine on neuroretinal function and retinal vascular changes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(11), pp.5152–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962468> [Accessed June 23, 2014].

KUWABARA, T. & COGAN, D.G., 1963. Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. *Archives of ophthalmology*, 69, pp.492–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13927676> [Accessed March 27, 2014].

Lachin, J.M. et al., 2008. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial--revisited. *Diabetes*, 57(4), pp.995–1001. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18223010> [Accessed July 5, 2014].

Lalwani, G. a et al., 2009. A variable-dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the PrONTO Study. *American journal of ophthalmology*, 148(1), pp.43–58.e1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376495> [Accessed November 3, 2013].

Lam, D.S.C. et al., 2007. Intravitreal triamcinolone plus sequential grid laser versus triamcinolone or laser alone for treating diabetic macular edema: six-month outcomes. *Ophthalmology*, 114(12), pp.2162–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459479> [Accessed June 5, 2014].

Lammer, J. et al., 2011. Retinal thickness and volume measurements in diabetic macular edema: a comparison of four optical coherence tomography systems. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31(1), pp.48–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683379> [Accessed June 6, 2014].

Landau, D. et al., 1997. Quantitative in vivo retinal thickness measurements in healthy subjects. *Ophthalmology*, 104(4), pp.639–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111256> [Accessed May 7, 2014].

- Langeler, E.G., Snelting-Havinga, I. & van Hinsbergh, V.W., 1989. Passage of low density lipoproteins through monolayers of human arterial endothelial cells. Effects of vasoactive substances in an in vitro model. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 9(4), pp.550–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2473734> [Accessed April 29, 2014].
- Lattanzio, R. et al., 2002. Macular thickness measured by optical coherence tomography (OCT) in diabetic patients. *European journal of ophthalmology*, 12(6), pp.482–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12510717> [Accessed April 23, 2014].
- Laursen, M.L. et al., 2004. Subthreshold micropulse diode laser treatment in diabetic macular oedema. *The British journal of ophthalmology*, 88(9), pp.1173–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1772323&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 17, 2014].
- Lawrence, M.G., 2004. The accuracy of digital-video retinal imaging to screen for diabetic retinopathy: an analysis of two digital-video retinal imaging systems using standard stereoscopic seven-field photography and dilated clinical examination as reference standards. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 102, pp.321–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1280108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Leal, E.C. et al., 2007. Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(11), pp.5257–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962481> [Accessed April 21, 2014].
- Lecleire-Collet, A. et al., 2011. Evaluation of retinal function and flicker light-induced retinal vascular response in normotensive patients with diabetes without retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(6), pp.2861–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282578> [Accessed June 23, 2014].
- Lee, A.Y. & Chung, S.S., 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(1), pp.23–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872926> [Accessed March 20, 2014].
- Lee, P. & Blumberg, D.M., 2008. Understanding the critical importance of diagnosis in the measurement of quality of care. *Archives of ophthalmology*, 126(3), pp.426–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18332329> [Accessed April 28, 2014].
- Legarreta, J.E. et al., 2008. Macular thickness measurements in normal eyes using spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye*, 39(4 Suppl), pp.S43–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777876> [Accessed June 5, 2014].
- Leiter, L.A. et al., 2001. Diabetes Screening in Canada (DIASCAN) Study: prevalence of undiagnosed diabetes and glucose intolerance in family physician offices. *Diabetes care*, 24(6), pp.1038–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375367> [Accessed June 14, 2014].

- Leung, C.K. et al., 2008. Comparison of macular thickness measurements between time domain and spectral domain optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(11), pp.4893–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450592> [Accessed May 1, 2014].
- Lewis, H. et al., 1992. Vitrectomy for diabetic macular traction and edema associated with posterior hyaloidal traction. *Ophthalmology*, 99(5), pp.753–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1594222> [Accessed February 11, 2014].
- Li, Q. et al., 2002. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Experimental eye research*, 74(5), pp.615–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076083> [Accessed April 22, 2014].
- Li, Y.M. et al., 1996. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), pp.11047–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 20, 2014].
- Liesenfeld, B. et al., 2000. A telemedical approach to the screening of diabetic retinopathy: digital fundus photography. *Diabetes care*, 23(3), pp.345–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10868863> [Accessed June 14, 2014].
- Lieth, E. et al., 1998. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*, 47(5), pp.815–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588455> [Accessed April 22, 2014].
- Lin, D.Y. et al., 2002. The sensitivity and specificity of single-field nonmydriatic monochromatic digital fundus photography with remote image interpretation for diabetic retinopathy screening: a comparison with ophthalmoscopy and standardized mydriatic color photography. *American journal of ophthalmology*, 134(2), pp.204–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12140027> [Accessed June 14, 2014].
- Liu, M.M. et al., 2014. Comparison of time- and spectral-domain optical coherence tomography in management of diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(3), pp.1370–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24526445> [Accessed May 31, 2014].
- Liu, Y. et al., 2012. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) peptide eye drops reduce inflammation, cell death and vascular leakage in diabetic retinopathy in Ins2(Akita) mice. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 18, pp.1387–401. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3533643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 23, 2014].
- Lobo, C. et al., 1999. Novel imaging techniques for diabetic macular edema. *Doc Ophthalmol*, 97, pp.341–7 %O (35) eng %O (37) Center of Ophthalmology,. Available at: 10896349.
- Lobo, C.L. et al., 1999. Mapping retinal fluorescein leakage with confocal scanning laser fluorometry of the human vitreous. *Archives of ophthalmology*, 117(5), pp.631–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10326960> [Accessed June 15, 2014].

- Lobo, C.L. et al., 2004. Three-year follow-up study of blood-retinal barrier and retinal thickness alterations in patients with type 2 diabetes mellitus and mild nonproliferative diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology*, 122(2), pp.211–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14769598> [Accessed February 10, 2014].
- Looker, H.C. et al., 2007. Genome-wide linkage analyses to identify Loci for diabetic retinopathy. *Diabetes*, 56(4), pp.1160–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395753> [Accessed February 21, 2014].
- Lopes de Faria, J.M. et al., 2001. Neurovisual abnormalities preceding the retinopathy in patients with long-term type 1 diabetes mellitus. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 239(9), pp.643–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688662> [Accessed April 22, 2014].
- Lorenzi, M., 1992. Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes: the cellular perspective. *Diabetes/metabolism reviews*, 8(2), pp.85–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1425126> [Accessed February 14, 2014].
- Lorenzi, M. & Gerhardinger, C., 2001. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia*, 44(7), pp.791–804. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11508263> [Accessed February 14, 2014].
- Lu, M. et al., 1999. VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(8), pp.1808–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393052> [Accessed March 30, 2014].
- Ludovico, J. et al., 2003. Alterations of retinal capillary blood flow in preclinical retinopathy in subjects with type 2 diabetes. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 241(3), pp.181–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644940> [Accessed February 10, 2014].
- Lutty, G.A. et al., 1996. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. *Archives of ophthalmology*, 114(8), pp.971–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8694733> [Accessed April 17, 2014].
- Lutty, G.A., 2013. Effects of diabetes on the eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(14), pp.ORSF81–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335073> [Accessed March 19, 2014].
- Luu, C.D. et al., 2010. Correlation between retinal oscillatory potentials and retinal vascular caliber in type 2 diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(1), pp.482–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19710418> [Accessed June 12, 2014].
- Maberley, D. et al., 2003. Screening for diabetic retinopathy in James Bay, Ontario: a cost-effectiveness analysis. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 168(2), pp.160–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=140424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 29, 2014].

- Mackenzie, S. et al., 2011. SDOCT imaging to identify macular pathology in patients diagnosed with diabetic maculopathy by a digital photographic retinal screening programme. *PLoS one*, 6(5), p.e14811. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3089611&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 3, 2014].
- Maheshwary, A.S. et al., 2010. The association between percent disruption of the photoreceptor inner segment-outer segment junction and visual acuity in diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 150, pp.63–67.e1.
- Malmfors, T., 1965. The adrenergic innervation of the eye as demonstrated by fluorescence microscopy. *Acta physiologica Scandinavica*, 65(3), pp.259–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4955982> [Accessed April 3, 2014].
- Mandarino, L.J., Finlayson, J. & Hassell, J.R., 1994. High glucose downregulates glucose transport activity in retinal capillary pericytes but not endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(3), pp.964–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8125759> [Accessed April 17, 2014].
- Marmor, M.F., 1999. Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 97(3-4), pp.239–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10896337> [Accessed April 26, 2014].
- Martidis, A. et al., 2002. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 109(5), pp.920–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986098> [Accessed July 17, 2014].
- Martin, D.F. et al., 2011. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*, 364(20), pp.1897–908. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3157322&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2014].
- Martin, D.F. et al., 2012. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology*, 119(7), pp.1388–98. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3389193&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 2, 2014].
- Maruko, I. et al., 2008. Early morphological changes and functional abnormalities in group 2A idiopathic juxtafoveolar retinal telangiectasis using spectral domain optical coherence tomography and microperimetry. *The British journal of ophthalmology*, 92(11), pp.1488–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703550> [Accessed November 4, 2013].
- Massin, P. et al., 2001. Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology*, 119(8), pp.1135–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483079> [Accessed May 3, 2014].
- Massin, P. et al., 2002. Retinal thickness in healthy and diabetic subjects measured using optical coherence tomography mapping software. *European journal of ophthalmology*, 12(2), pp.102–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022281> [Accessed May 1, 2014].



- Massin, P. et al., 2003. Optical coherence tomography for evaluating diabetic macular edema before and after vitrectomy. *American journal of ophthalmology*, 135, pp.169–177.
- Massin, P. et al., 2010. Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE Study): a 12-month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study. *Diabetes care*, 33(11), pp.2399–405. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2963502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 12, 2014].
- Matthews, D.R. et al., 2004. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Archives of ophthalmology*, 122(11), pp.1631–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534123> [Accessed February 11, 2014].
- McDonald, H.R. et al., 2007. Laser scanning imaging for macular disease: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*, 114(6), pp.1221–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17466377> [Accessed May 5, 2014].
- McKay, R., McCarty, C.A. & Taylor, H.R., 2000. Diabetic retinopathy in Victoria, Australia: the Visual Impairment Project. *The British journal of ophthalmology*, 84(8), pp.865–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1723577&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2014].
- McLellan, A.C. et al., 1994. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clinical science (London, England : 1979)*, 87(1), pp.21–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8062515> [Accessed March 20, 2014].
- Mei, S. et al., 2012. Mechanisms underlying somatostatin receptor 2 down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in response to hypoxia in mouse retinal explants. *The Journal of pathology*, 226(3), pp.519–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21960021> [Accessed July 3, 2014].
- Menke, M.N., Dabov, S., Knecht, P., et al., 2009. Reproducibility of retinal thickness measurements in healthy subjects using spectralis optical coherence tomography. *American journal of ophthalmology*, 147(3), pp.467–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026403> [Accessed November 3, 2013].
- Menke, M.N., Dabov, S. & Sturm, V., 2009. Comparison of three different optical coherence tomography models for total macular thickness measurements in healthy controls. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 223(6), pp.352–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571601> [Accessed June 18, 2014].
- Miljanovic, B. et al., 2004. A prospective study of serum lipids and risk of diabetic macular edema in type 1 diabetes. *Diabetes*, 53(11), pp.2883–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504969> [Accessed April 29, 2014].
- Mitchell, P. et al., 2011. The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 118(4), pp.615–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459215> [Accessed February 1, 2014].

- Miyamoto, K. et al., 1998. In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(11), pp.2190–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9761301> [Accessed March 29, 2014].
- Mizutani, M., Kern, T.S. & Lorenzi, M., 1996. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *The Journal of clinical investigation*, 97(12), pp.2883–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=507384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 27, 2014].
- Mohamed, Q., Gillies, M.C. & Wong, T.Y., 2007. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 298(8), pp.902–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17712074> [Accessed April 14, 2014].
- Moore, J. et al., 1999. Three dimensional analysis of microaneurysms in the human diabetic retina. *Journal of anatomy*, 194 ( Pt 1, pp.89–100. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1467897&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 23, 2014].
- Moreira, R.O. et al., 2001. Use of optical coherence tomography (OCT) and indirect ophthalmoscopy in the diagnosis of macular edema in diabetic patients. *International ophthalmology*, 24(6), pp.331–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14750570> [Accessed April 29, 2014].
- Moss, S.E., Klein, R. & Klein, B.E., 1988. The incidence of vision loss in a diabetic population. *Ophthalmology*, 95, pp.1340–1348.
- Moss, S.E., Klein, R. & Klein, B.E., 1995. Factors associated with having eye examinations in persons with diabetes. *Archives of family medicine*, 4(6), pp.529–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7773429> [Accessed June 14, 2014].
- Moss, S.E., Klein, R. & Klein, B.E., 1998. The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology*, 105(6), pp.998–1003. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9627648> [Accessed February 23, 2014].
- Murakami, T. et al., 2007. Photoreceptor status after resolved macular edema in branch retinal vein occlusion treated with tissue plasminogen activator. *American journal of ophthalmology*, 143(1), pp.171–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17188062> [Accessed May 6, 2014].
- Murakami, T., Felinski, E.A. & Antonetti, D.A., 2009. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *The Journal of biological chemistry*, 284(31), pp.21036–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2742868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 16, 2014].
- Murakami, T. et al., 2011a. Association of pathomorphology, photoreceptor status, and retinal thickness with visual acuity in diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology*,

- 151(2), pp.310–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145531> [Accessed May 15, 2014].
- Murakami, T. et al., 2011b. Foveal cystoid spaces are associated with enlarged foveal avascular zone and microaneurysms in diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 118(2), pp.359–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656355> [Accessed May 18, 2014].
- Murakami, T., Nishijima, K., et al., 2012a. Optical coherence tomographic reflectivity of photoreceptors beneath cystoid spaces in diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(3), pp.1506–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22323463> [Accessed May 15, 2014].
- Murakami, T., Nishijima, K., et al., 2012b. Segmentational analysis of retinal thickness after vitrectomy in diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(10), pp.6668–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952119> [Accessed May 15, 2014].
- Murakami, T., Frey, T., et al., 2012. Protein kinase c $\beta$  phosphorylates occludin regulating tight junction trafficking in vascular endothelial growth factor-induced permeability in vivo. *Diabetes*, 61(6), pp.1573–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3357276&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 15, 2014].
- Murakami, T. & Yoshimura, N., 2013. Structural changes in individual retinal layers in diabetic macular edema. *Journal of diabetes research*, 2013, p.920713. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3773460&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 15, 2014].
- Murata, T., Ishibashi, T. & Inomata, H., 1992. Immunohistochemical detection of extravasated fibrinogen (fibrin) in human diabetic retina. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 230, pp.428–431.
- Murata, T. et al., 1996. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 74(4), pp.819–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8606491> [Accessed February 15, 2014].
- Nagaoka, T. et al., 2004. Alteration of choroidal circulation in the foveal region in patients with type 2 diabetes. *The British journal of ophthalmology*, 88(8), pp.1060–3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1772269&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 26, 2014].
- Nathan, D.M. et al., 1991. Role of diabetologist in evaluating diabetic retinopathy. *Diabetes care*, 14(1), pp.26–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1991432> [Accessed June 14, 2014].
- Nathan, D.M., 1993. Long-term complications of diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*, 328(23), pp.1676–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8487827> [Accessed February 23, 2014].

- Nathan, D.M. et al., 2009. Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2. *Archives of internal medicine*, 169(14), pp.1307–16. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2866072&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 1, 2014].
- Nepomuceno, A.B. et al., 2013. A prospective randomized trial of intravitreal bevacizumab versus ranibizumab for the management of diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 156(3), pp.502–10.e2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23795985> [Accessed May 12, 2014].
- Neubauer, A.S. et al., 2001. Comparison of foveal thickness measured with the retinal thickness analyzer and optical coherence tomography. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 21(6), pp.596–601. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756882> [Accessed May 5, 2014].
- Newman, E. & Reichenbach, A., 1996. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends in neurosciences*, 19(8), pp.307–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8843598> [Accessed March 29, 2014].
- Ng, J.S. et al., 2008. Local diabetic retinopathy prediction by multifocal ERG delays over 3 years. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(4), pp.1622–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385083> [Accessed July 6, 2014].
- Nguyen, Q.D. et al., 2009. Primary End Point (Six Months) Results of the Ranibizumab for Edema of the mAcula in diabetes (READ-2) study. *Ophthalmology*, 116(11), pp.2175–81.e1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700194> [Accessed June 2, 2014].
- Nguyen, Q.D. et al., 2012. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology*, 119(4), pp.789–801. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330964> [Accessed May 31, 2014].
- Nicholson, B.P. & Schachat, A.P., 2010. A review of clinical trials of anti-VEGF agents for diabetic retinopathy. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 248(7), pp.915–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20174816> [Accessed May 6, 2014].
- Nishikawa, T. et al., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404(6779), pp.787–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783895> [Accessed March 20, 2014].
- Nishiwaki, H. et al., 1995. Quantitative evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 36(1), pp.123–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7822139> [Accessed March 30, 2014].
- Nishiwaki, H. et al., 2002. Relation between retinal thickening and clinically visible fundus pathologies in mild nonproliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic surgery and lasers*, 33(2), pp.127–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11942544> [Accessed April 23, 2014].

- Noda, K. et al., 2012. Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. *Journal of ophthalmology*, 2012, p.279037. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3216271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 30, 2014].
- Nordwall, M. et al., 2004. Declining incidence of severe retinopathy and persisting decrease of nephropathy in an unselected population of Type 1 diabetes-the Linköping Diabetes Complications Study. *Diabetologia*, 47(7), pp.1266–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15235773> [Accessed July 8, 2014].
- Nunes, S. et al., 2009. Microaneurysm turnover is a biomarker for diabetic retinopathy progression to clinically significant macular edema: findings for type 2 diabetics with nonproliferative retinopathy. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. Internationale journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 223(5), pp.292–297.
- Nunes, S. et al., 2010. Central retinal thickness measured with HD-OCT shows a weak correlation with visual acuity in eyes with CSME. *The British journal of ophthalmology*, 94(9), pp.1201–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530184> [Accessed February 10, 2014].
- Nunes, S. et al., 2013. Three different phenotypes of mild nonproliferative diabetic retinopathy with different risks for development of clinically significant macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(7), pp.4595–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23745006> [Accessed March 31, 2014].
- Oishi, A. et al., 2009. Photoreceptor integrity and visual acuity in cystoid macular oedema associated with retinitis pigmentosa. *Eye (London, England)*, 23, pp.1411–1416.
- Oliveira, C.M. et al., 2011. Improved automated screening of diabetic retinopathy. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. Internationale journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 226(4), pp.191–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21865671> [Accessed June 29, 2014].
- Ooto, S. et al., 2010. Three-dimensional profile of macular retinal thickness in normal Japanese eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(1), pp.465–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19696169> [Accessed April 30, 2014].
- Osaadon, P. et al., 2014. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. *Eye (London, England)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24525867> [Accessed February 15, 2014].
- Oshitari, T., Hanawa, K. & Adachi-Usami, E., 2007. Macular and retinal nerve fiber layer thickness in Japanese measured by Stratus optical coherence tomography. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 1(2), pp.133–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2704514&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 3, 2014].
- Oshitari, T., Hanawa, K. & Adachi-Usami, E., 2009. Changes of macular and RNFL thicknesses measured by Stratus OCT in patients with early stage diabetes. *Eye (London, England)*, 23(4), pp.884–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437178> [Accessed May 2, 2014].

## Referências

- Ota, M. et al., 2010. Optical coherence tomographic evaluation of foveal hard exudates in patients with diabetic maculopathy accompanying macular detachment. *Ophthalmology*, 117(10), pp.1996–2002. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723993> [Accessed May 12, 2014].
- Otani, T., Kishi, S. & Maruyama, Y., 1999. Patterns of diabetic macular edema with optical coherence tomography. *American journal of ophthalmology*, 127, pp.688–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10372879>.
- Otani, T. & Kishi, S., 2000. Tomographic assessment of vitreous surgery for diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 129(4), pp.487–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764858> [Accessed May 12, 2014].
- Otani, T. & Kishi, S., 2007. Correlation between optical coherence tomography and fluorescein angiography findings in diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 114(1), pp.104–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17070586> [Accessed May 5, 2014].
- Otani, T., Yamaguchi, Y. & Kishi, S., 2010. Correlation between visual acuity and foveal microstructural changes in diabetic macular edema. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 30(5), pp.774–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996821> [Accessed May 6, 2014].
- Ozdek, S.C. et al., 2005. Optical coherence tomographic assessment of diabetic macular edema: comparison with fluorescein angiographic and clinical findings. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 219(2), pp.86–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802932> [Accessed April 28, 2014].
- Ozdemir, H., Karacorlu, M. & Karacorlu, S.A., 2005. Regression of serous macular detachment after intravitreal triamcinolone acetonide in patients with diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 140(2), pp.251–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15992756> [Accessed July 17, 2014].
- Panagiotoglou, T.D. et al., 2010. Atorvastatin for diabetic macular edema in patients with diabetes mellitus and elevated serum cholesterol. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye*, 41(3), pp.316–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20507015> [Accessed April 29, 2014].
- Panozzo, G. et al., 2004. Diabetic macular edema: an OCT-based classification. *Seminars in ophthalmology*, 19(1-2), pp.13–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15658007> [Accessed May 12, 2014].
- Park, S.-H. et al., 2003. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia*, 46(9), pp.1260–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12898017> [Accessed April 21, 2014].
- Patel, J.I. et al., 2006. Pars plana vitrectomy for diabetic macular oedema: OCT and functional correlations. *Eye (London, England)*, 20(6), pp.674–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16244647> [Accessed May 6, 2014].
- Patel, J.I. et al., 2006. Vitreous and aqueous concentrations of proangiogenic, antiangiogenic factors and other cytokines in diabetic retinopathy patients with macular edema:

- Implications for structural differences in macular profiles. *Experimental eye research*, 82(5), pp.798–806. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16324700> [Accessed February 11, 2014].
- Patel, J.I. et al., 2008. Concentration of haemodynamic and inflammatory related cytokines in diabetic retinopathy. *Eye (London, England)*, 22(2), pp.223–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17001327> [Accessed April 27, 2014].
- Patel, N. et al., 2013. Sensitivity and specificity of time-domain versus spectral-domain optical coherence tomography in diabetic macular edema. *Indian journal of ophthalmology*, 61(5), pp.208–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3730503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 19, 2014].
- Paunescu, L.A. et al., 2004. Reproducibility of nerve fiber thickness, macular thickness, and optic nerve head measurements using StratusOCT. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(6), pp.1716–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1993821&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
- Paunescu, L.A. et al., 2006. Idiopathic juxtafoveal retinal telangiectasis: new findings by ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 113(1), pp.48–57. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1941653&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 9, 2014].
- Perrier, M. et al., 2003. Comparison of two, three and four 45 degrees image fields obtained with the Topcon CRW6 nonmydriatic camera for screening for diabetic retinopathy. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 38(7), pp.569–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14740798> [Accessed June 14, 2014].
- Perros, P. et al., 1997. Brain abnormalities demonstrated by magnetic resonance imaging in adult IDDM patients with and without a history of recurrent severe hypoglycemia. *Diabetes care*, 20(6), pp.1013–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9167117> [Accessed February 21, 2014].
- Peto, T. & Tadros, C., 2012. Screening for diabetic retinopathy and diabetic macular edema in the United Kingdom. *Current diabetes reports*, 12(4), pp.338–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22729994> [Accessed June 30, 2014].
- Petrella, R.J. et al., 2012. Prevalence, Demographics, and Treatment Characteristics of Visual Impairment due to Diabetic Macular Edema in a Representative Canadian Cohort. *Journal of ophthalmology*, 2012, p.159167. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3529901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 12, 2014].
- Pircher, M. et al., 2006. Human macula investigated in vivo with polarization-sensitive optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(12), pp.5487–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122140> [Accessed November 3, 2013].

- Pires, I. et al., 2002. Retinal thickness in eyes with mild nonproliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus: comparison of measurements obtained by retinal thickness analysis and optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology*, 120(10), pp.1301–1306.
- Pires, I., Santos, A.R., Nunes, S. & Lobo, C., 2013. Macular thickness measured by stratus optical coherence tomography in patients with diabetes type 2 and mild nonproliferative retinopathy without clinical evidence of macular edema. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 229(4), pp.181–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23614970> [Accessed May 2, 2014].
- Pires, I., Santos, A.R., Nunes, S., Lobo, C., et al., 2013. Subclinical Macular Edema as a Predictor of Progression to Clinically Significant Macular Edema in Type 2 Diabetes. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, pp.9–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080704> [Accessed November 1, 2013].
- Polito, A. et al., 2002. Comparison between retinal thickness analyzer and optical coherence tomography for assessment of foveal thickness in eyes with macular disease. *American journal of ophthalmology*, 134(2), pp.240–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12140031> [Accessed May 7, 2014].
- Polito, A. et al., 2005. Repeatability and reproducibility of fast macular thickness mapping with stratus optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology*, 123(10), pp.1330–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16219723> [Accessed April 29, 2014].
- Porta, M., 1996. Endothelium: the main actor in the remodelling of the retinal microvasculature in diabetes. *Diabetologia*, 39(6), pp.739–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781772> [Accessed March 27, 2014].
- Poulaki, V. et al., 2002. Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF. *The Journal of clinical investigation*, 109(6), pp.805–15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=150907&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
- Pournaras, C.J. et al., 2008. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Progress in retinal and eye research*, 27(3), pp.284–330. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448380> [Accessed May 28, 2014].
- Puliafito, C.A. et al., 1995. Imaging of macular diseases with optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 102(2), pp.217–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7862410> [Accessed April 29, 2014].
- Querques, G. et al., 2012. Enhanced depth imaging optical coherence tomography in type 2 diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(10), pp.6017–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22879414> [Accessed May 18, 2014].
- Quigley, M.G., 2007. Prognosis and retinal vessel features. *Ophthalmology*, 114(9), pp.1796–7; author reply 1797. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822996> [Accessed February 13, 2014].



- Quintyn, J.-C. & Brasseur, G., 2004. Subretinal fluid in primary rhegmatogenous retinal detachment: physiopathology and composition. *Survey of ophthalmology*, 49(1), pp.96–108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711443> [Accessed April 24, 2014].
- Rahman, S. et al., 2007. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes, obesity & metabolism*, 9(6), pp.767–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17924861> [Accessed February 15, 2014].
- Ramalho, L.H. de A. et al., 2009. [Subclinical diabetic macular edema and mild non-proliferative diabetic retinopathy: data correlation with the retinal thickness analyzer (RTA)]. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, 72(4), pp.503–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820790> [Accessed May 7, 2014].
- Raman, R. et al., 2009. Prevalence of diabetic retinopathy in India: Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetics Study report 2. *Ophthalmology*, 116(2), pp.311–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084275> [Accessed June 14, 2014].
- Raman, R. et al., 2010. Influence of serum lipids on clinically significant versus nonclinically significant macular edema: SN-DREAMS Report number 13. *Ophthalmology*, 117(4), pp.766–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045565> [Accessed April 29, 2014].
- Ray, R., Stinnett, S.S. & Jaffe, G.J., 2005. Evaluation of image artifact produced by optical coherence tomography of retinal pathology. *American journal of ophthalmology*, 139(1), pp.18–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652824> [Accessed April 30, 2014].
- Reichenbach, A. & Bringmann, A., 2013. New functions of Müller cells. *Glia*, 61(5), pp.651–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23440929> [Accessed March 29, 2014].
- Remky, A., Arend, O. & Hendricks, S., 2000. Short-wavelength automated perimetry and capillary density in early diabetic maculopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(1), pp.274–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634631> [Accessed April 16, 2014].
- Ribeiro, M.L., Nunes, S.G. & Cunha-Vaz, J.G., 2013. Microaneurysm turnover at the macula predicts risk of development of clinically significant macular edema in persons with mild nonproliferative diabetic retinopathy. *Diabetes care*, 36(5), pp.1254–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204247> [Accessed April 24, 2014].
- Ricco, J.B. et al., 2013. The diabetic foot: a review. *The Journal of cardiovascular surgery*, 54(6), pp.755–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126512> [Accessed April 23, 2014].
- Roh, M.I., Kim, J.H. & Kwon, O.W., 2010. Features of optical coherence tomography are predictive of visual outcomes after intravitreal bevacizumab injection for diabetic macular edema. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 224(6), pp.374–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453545> [Accessed May 5, 2014].

- Romero-Aroca, P., 2011. Managing diabetic macular edema: The leading cause of diabetes blindness. *World journal of diabetes*, 2(6), pp.98–104. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3158878&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 28, 2014].
- Roy, M.S. & Klein, R., 2001. Macular edema and retinal hard exudates in African Americans with type 1 diabetes: the New Jersey 725. *Archives of ophthalmology*, 119(2), pp.251–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11176988> [Accessed April 29, 2014].
- Roy, M.S., 2004. Eye care in African Americans with type 1 diabetes: the New Jersey 725. *Ophthalmology*, 111(5), pp.914–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121368> [Accessed June 14, 2014].
- Rubino, A. et al., 2007. Diagnosed diabetic retinopathy in France, Italy, Spain, and the United Kingdom. *Primary care diabetes*, 1(2), pp.75–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632023> [Accessed April 15, 2014].
- Rudnisky, C.J. et al., 2002. High-resolution stereoscopic digital fundus photography versus contact lens biomicroscopy for the detection of clinically significant macular edema. *Ophthalmology*, 109(2), pp.267–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825807> [Accessed April 25, 2014].
- Ryan, E.H. et al., 2006. Diabetic macular edema associated with glitazone use. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 26(5), pp.562–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16770264> [Accessed April 29, 2014].
- Sadda, S.R., Tan, O., et al., 2006. Automated detection of clinically significant macular edema by grid scanning optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 113(7), pp.1187.e1–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1779509&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 6, 2014].
- Sadda, S.R., Wu, Z., et al., 2006. Errors in retinal thickness measurements obtained by optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 113(2), pp.285–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406542> [Accessed April 30, 2014].
- Sahakyan, K. et al., 2011. The 25-year cumulative incidence of lower extremity amputations in people with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 34(3), pp.649–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3041199&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 21, 2014].
- Della Sala, S. et al., 1985. Impaired contrast sensitivity in diabetic patients with and without retinopathy: a new technique for rapid assessment. *The British journal of ophthalmology*, 69(2), pp.136–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1040540&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 17, 2014].
- Sánchez-Tocino, H. et al., 2002. Retinal thickness study with optical coherence tomography in patients with diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(5), pp.1588–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980878> [Accessed May 1, 2014].

- Sandberg, M.A. et al., 2005. The association between visual acuity and central retinal thickness in retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(9), pp.3349–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123439> [Accessed May 6, 2014].
- Sander, B. et al., 1994. Early changes in diabetic retinopathy: capillary loss and blood-retina barrier permeability in relation to metabolic control. *Acta ophthalmologica*, 72(5), pp.553–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7887152> [Accessed March 16, 2014].
- Sander, B. et al., 2001. Diabetic macular edema: passive and active transport of fluorescein through the blood-retina barrier. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(2), pp.433–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157879> [Accessed April 24, 2014].
- Santiago, A.R. et al., 2007. High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiology of disease*, 25(3), pp.464–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239603> [Accessed April 21, 2014].
- Santos, A.R. et al., 2014. Degree of decrease in central retinal thickness predicts visual acuity response to intravitreal ranibizumab in diabetic macular edema. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 231(1), pp.16–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280908> [Accessed May 31, 2014].
- Sasaki, M. et al., 2014. Association of serum lipids with macular thickness and volume in type 2 diabetes without diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(3), pp.1749–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569581> [Accessed May 19, 2014].
- Saxena, R. et al., 2007. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5829), pp.1331–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17463246> [Accessed January 21, 2014].
- Sayeski, P.P. & Kudlow, J.E., 1996. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor- $\alpha$  gene transcription. *The Journal of biological chemistry*, 271(25), pp.15237–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663078> [Accessed March 20, 2014].
- Scanlon, P.H. et al., 2005. An evaluation of the change in activity and workload arising from diabetic ophthalmology referrals following the introduction of a community based digital retinal photographic screening programme. *The British journal of ophthalmology*, 89(8), pp.971–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1772755&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2014].
- Scanlon, P.H., Foy, C. & Chen, F.K., 2008. Visual acuity measurement and ocular co-morbidity in diabetic retinopathy screening. *The British journal of ophthalmology*, 92(6), pp.775–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18356262> [Accessed June 14, 2014].
- Schepens, C.L. et al., 1984. Role of the vitreous in cystoid macular edema. *Survey of ophthalmology*, 28 Suppl, pp.499–504. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6463849> [Accessed July 7, 2014].

- Scholl, S., Kirchhof, J. & Augustin, A.J., 2010. Pathophysiology of macular edema. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 224 Suppl , pp.8–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714176> [Accessed April 26, 2014].
- Schrier, R.W. et al., 2002. Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetic patients on albuminuria, retinopathy and strokes. *Kidney international*, 61(3), pp.1086–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849464> [Accessed February 23, 2014].
- Schuman, J.S., Puliafito, C.A. & Fujimoto, J.G., 2004. *Optical coherence tomography of ocular diseases* 2nd ed., SLACK Inc.
- Scott, I.U. et al., 2007. A phase II randomized clinical trial of intravitreal bevacizumab for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 114(10), pp.1860–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2245885&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 12, 2014].
- Sebag, J. & Balazs, E.A., 1984. Pathogenesis of cystoid macular edema: an anatomic consideration of vitreoretinal adhesions. *Survey of ophthalmology*, 28 Suppl, pp.493–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6379948> [Accessed April 24, 2014].
- Seeman, T. et al., 1993. Risk factors for coronary heart disease among older men and women: a prospective study of community-dwelling elderly. *American journal of epidemiology*, 138(12), pp.1037–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8266906> [Accessed February 21, 2014].
- Sena, C.M., Pereira, A.M. & Seça, R., 2013. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(12), pp.2216–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994612> [Accessed March 19, 2014].
- Senger, D.R. et al., 1993. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer metastasis reviews*, 12(3-4), pp.303–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8281615> [Accessed January 30, 2014].
- Shah, S.P. et al., 2006. Factors predicting outcome of vitrectomy for diabetic macular oedema: results of a prospective study. *The British journal of ophthalmology*, 90(1), pp.33–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1856901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 5, 2014].
- Shahidi, M. et al., 1991. Retinal thickness analysis for quantitative assessment of diabetic macular edema. *Archives of ophthalmology*, 109, pp.1115–1119.
- Shakib, M. & Cunha-Vaz, J.G., 1966. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. IV. Junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. *Experimental eye research*, 5(3), pp.229–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5914655> [Accessed February 8, 2014].
- Shea, A.M. et al., 2008. Resource use and costs associated with diabetic macular edema in elderly persons. *Archives of ophthalmology*, 126(12), pp.1748–54. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2630411&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 23, 2014].

Sheetz, M.J. et al., 2013. The effect of the oral PKC  $\beta$  inhibitor ruboxistaurin on vision loss in two phase 3 studies. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(3), pp.1750–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23404115> [Accessed June 2, 2014].

Shen, W. et al., 2010. Retinal vascular changes after glial disruption in rats. *Journal of neuroscience research*, 88(7), pp.1485–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029988> [Accessed February 15, 2014].

Shen, X. et al., 2011. Effect of pigment epithelium derived factor on the expression of glutamine synthetase in early phase of experimental diabetic retinopathy. *Ocular immunology and inflammation*, 19(4), pp.246–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21770802> [Accessed July 3, 2014].

Shimura, M. et al., 2008. Comparative therapy evaluation of intravitreal bevacizumab and triamcinolone acetonide on persistent diffuse diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 145(5), pp.854–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18328456> [Accessed November 2, 2013].

Shimura, M. et al., 2011. Visual outcome after intravitreal triamcinolone acetonide depends on optical coherence tomographic patterns in patients with diffuse diabetic macular edema. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31(4), pp.748–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21836404> [Accessed May 15, 2014].

Shin, H.J. et al., 2012. Association between photoreceptor integrity and visual outcome in diabetic macular edema. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 250(1), pp.61–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21874345> [Accessed May 15, 2014].

Shinohara, M. et al., 1998. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *The Journal of clinical investigation*, 101(5), pp.1142–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=508666&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 20, 2014].

Siemerink, M.J., Augustin, A.J. & Schlingemann, R.O., 2010. Mechanisms of ocular angiogenesis and its molecular mediators. *Developments in ophthalmology*, 46, pp.4–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703029> [Accessed February 15, 2014].

Silva, K.C. et al., 2009. Diabetic retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial oxidative stress and is improved by an angiotensin receptor blocker in a model combining hypertension and diabetes. *Diabetes*, 58(6), pp.1382–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2682683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 31, 2014].

Simó, R. & Hernández, C., 2012. Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications. *The British journal of ophthalmology*, 96(10), pp.1285–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22887976> [Accessed June 28, 2014].

- Simó, R. & Hernández, C., 2014. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 25(1), pp.23–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183659> [Accessed May 23, 2014].
- Simó-Servat, O., Hernández, C. & Simó, R., 2013. Genetics in diabetic retinopathy: current concepts and new insights. *Current genomics*, 14(5), pp.289–99. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3763680&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 13, 2014].
- Sinclair, S.H. et al., 1982. Retinal vascular autoregulation in diabetes mellitus. *Ophthalmology*, 89(7), pp.748–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7122050> [Accessed February 11, 2014].
- Sinclair, S.H. et al., 1984. Macular edema and pregnancy in insulin-dependent diabetes. *American journal of ophthalmology*, 97(2), pp.154–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6696026> [Accessed April 29, 2014].
- Singer, D.E. et al., 1992. Screening for diabetic retinopathy. *Annals of internal medicine*, 116(8), pp.660–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1546868> [Accessed February 23, 2014].
- Singer, M.A. et al., 2012. HORIZON: an open-label extension trial of ranibizumab for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 119(6), pp.1175–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306121> [Accessed May 24, 2014].
- Singh, V.P. et al., 2014. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 18(1), pp.1–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3951818&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 23, 2014].
- Sivaprasad, S. et al., 2012. Prevalence of diabetic retinopathy in various ethnic groups: a worldwide perspective. *Survey of ophthalmology*, 57(4), pp.347–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542913> [Accessed April 29, 2014].
- Sloan, F.A. et al., 2008. Changes in incidence of diabetes mellitus-related eye disease among US elderly persons, 1994-2005. *Archives of ophthalmology*, 126(11), pp.1548–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3578294&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 23, 2014].
- Sng, C.C.A. et al., 2012. Influence of diabetes on macular thickness measured using optical coherence tomography: the Singapore Indian Eye Study. *Eye (London, England)*, 26(5), pp.690–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3351047&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 2, 2014].
- Sobrin, L. et al., 2011. Candidate gene association study for diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the Candidate gene Association Resource (CARE). *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(10), pp.7593–602. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3183981&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 23, 2014].

Sokol, S. et al., 1985. Contrast sensitivity in diabetics with and without background retinopathy. *Archives of ophthalmology*, 103(1), pp.51–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3977675> [Accessed April 17, 2014].

Soliman, W. et al., 2008. The predictive value of optical coherence tomography after grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular oedema. *Acta ophthalmologica*, 86(3), pp.284–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18005220> [Accessed May 6, 2014].

Spaide, R.F., 2009. Age-related choroidal atrophy. *American journal of ophthalmology*, 147(5), pp.801–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232561> [Accessed May 4, 2014].

Spaide, R.F. & Curcio, C.A., 2011. Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31(8), pp.1609–19. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3619110&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 15, 2014].

Srinivasan, V.J. et al., 2006. High-definition and 3-dimensional imaging of macular pathologies with high-speed ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 113(11), pp.2054.e1–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1939823&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 30, 2014].

Srinivasan, V.J. et al., 2008. Characterization of outer retinal morphology with high-speed, ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(4), pp.1571–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2846094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 18, 2014].

Stamler, J. et al., 1993. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes care*, 16(2), pp.434–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8432214> [Accessed February 21, 2014].

Stefánsson, E. et al., 2000. Screening and prevention of diabetic blindness. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 78(4), pp.374–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10990036> [Accessed June 30, 2014].

Stefánsson, E., 2006. Ocular oxygenation and the treatment of diabetic retinopathy. *Survey of ophthalmology*, 51(4), pp.364–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818083> [Accessed February 11, 2014].

Stellingwerf, C., Hardus, P.L.L.J. & Hooymans, J.M.M., 2004. Assessing diabetic retinopathy using two-field digital photography and the influence of JPEG-compression. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 108(3), pp.203–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573944> [Accessed June 14, 2014].

- Stem, M.S. & Gardner, T.W., 2013. Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Current medicinal chemistry*, 20(26), pp.3241–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4071765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 5, 2014].
- Stirban, A., Gawlowski, T. & Roden, M., 2014. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Molecular metabolism*, 3(2), pp.94–108. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3953708&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 24, 2014].
- Stratton, I.M. et al., 2001. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia*, 44(2), pp.156–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11270671> [Accessed February 11, 2014].
- Sugimoto, M. et al., 2005. Detection of early diabetic change with optical coherence tomography in type 2 diabetes mellitus patients without retinopathy. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 219(6), pp.379–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286799> [Accessed May 3, 2014].
- Sull, A.C. et al., 2010. Comparison of spectral/Fourier domain optical coherence tomography instruments for assessment of normal macular thickness. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 30(2), pp.235–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2819609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 30, 2014].
- Swanson, E.A. et al., 1993. In vivo retinal imaging by optical coherence tomography. *Optics letters*, 18(21), pp.1864–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19829430> [Accessed April 30, 2014].
- Swanson, M., 2005. Retinopathy screening in individuals with type 2 diabetes: who, how, how often, and at what cost--an epidemiologic review. *Optometry (St. Louis, Mo.)*, 76(11), pp.636–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298316> [Accessed June 14, 2014].
- Takagi, H., King, G.L. & Aiello, L.P., 1998. Hypoxia upregulates glucose transport activity through an adenosine-mediated increase of GLUT1 expression in retinal capillary endothelial cells. *Diabetes*, 47(9), pp.1480–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9726238> [Accessed April 21, 2014].
- Tang, J. & Kern, T.S., 2011. Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*, 30(5), pp.343–58. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3433044&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 3, 2014].
- Tangelder, G.J.M. et al., 2008. Precision and reliability of retinal thickness measurements in foveal and extrafoveal areas of healthy and diabetic eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(6), pp.2627–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515592> [Accessed May 7, 2014].



- Toth, C.A. et al., 1997. A comparison of retinal morphology viewed by optical coherence tomography and by light microscopy. *Archives of ophthalmology*, 115, pp.1425–1428.
- Tranos, P.G. et al., 2004. Macular edema. *Survey of ophthalmology*, 49(5), pp.470–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325193> [Accessed April 22, 2014].
- Tso, M.O. et al., 1980. Clinicopathologic study of blood-retinal barrier in experimental diabetes mellitus. *Archives of ophthalmology*, 98(11), pp.2032–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7436840> [Accessed April 24, 2014].
- Tso, M.O., 1982. Pathology of cystoid macular edema. *Ophthalmology*, 89(8), pp.902–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7133637> [Accessed May 12, 2014].
- TsujiKawa, A. et al., 1999. Quantitative analysis of diabetic macular edema after scatter laser photocoagulation with the scanning retinal thickness analyzer. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 19(1), pp.59–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10048375> [Accessed May 7, 2014].
- Tung, T.-H. et al., 2008. Economic evaluation of screening for diabetic retinopathy among Chinese type 2 diabetics: a community-based study in Kinmen, Taiwan. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association*, 18(5), pp.225–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18776707> [Accessed June 14, 2014].
- Uccioli, L. et al., 1995. Electrophysiological assessment of visual function in newly-diagnosed IDDM patients. *Diabetologia*, 38(7), pp.804–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556982> [Accessed April 21, 2014].
- Uji, A. et al., 2012. Association between hyperreflective foci in the outer retina, status of photoreceptor layer, and visual acuity in diabetic macular edema. *American journal of ophthalmology*, 153(4), pp.710–7, 717.e1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22137207> [Accessed May 15, 2014].
- UKPDS, 1990. UK Prospective Diabetes Study 6. Complications in newly diagnosed type 2 diabetic patients and their association with different clinical and biochemical risk factors. *Diabetes research (Edinburgh, Scotland)*, 13(1), pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2097090> [Accessed February 20, 2014].
- UKPDS, 1998a. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, 352(9131), pp.837–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742976> [Accessed January 21, 2014].
- UKPDS, 1998b. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ (Clinical research ed.)*, 317(7160), pp.703–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=28659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 23, 2014].
- Varma, R. et al., 2004. Prevalence of diabetic retinopathy in adult Latinos: the Los Angeles Latino eye study. *Ophthalmology*, 111(7), pp.1298–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234129> [Accessed April 23, 2014].

- Vijan, S., Hofer, T.P. & Hayward, R.A., 2000. Cost-utility analysis of screening intervals for diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 283(7), pp.889–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685713> [Accessed June 14, 2014].
- Vinores, S.A. et al., 1989. Immunohistochemical localization of blood-retinal barrier breakdown in human diabetics. *The American journal of pathology*, 134(2), pp.231–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1879597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 21, 2014].
- Vinores, S.A. et al., 1993. Electron microscopic immunocytochemical demonstration of blood-retinal barrier breakdown in human diabetics and its association with aldose reductase in retinal vascular endothelium and retinal pigment epithelium. *The Histochemical journal*, 25(9), pp.648–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226103> [Accessed April 21, 2014].
- Virgili, G. et al., 2007. Optical coherence tomography versus stereoscopic fundus photography or biomicroscopy for diagnosing diabetic macular edema: a systematic review. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(11), pp.4963–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962446> [Accessed November 2, 2013].
- Vitale, S. et al., 1995. Clinically significant macular edema in type I diabetes. Incidence and risk factors. *Ophthalmology*, 102(8), pp.1170–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9097743> [Accessed April 23, 2014].
- Vlassara, H. et al., 1988. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4858), pp.1546–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3259727> [Accessed March 20, 2014].
- Vlassara, H. et al., 1995. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 1(6), pp.634–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2229987&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 20, 2014].
- Vlassara, H., 1997. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes*, 46 Suppl 2, pp.S19–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285494> [Accessed March 27, 2014].
- Vujosevic, S. & Midena, E., 2013. Retinal layers changes in human preclinical and early clinical diabetic retinopathy support early retinal neuronal and Müller cells alterations. *Journal of diabetes research*, 2013, p.905058. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3694491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 15, 2014].
- Waltman, S. et al., 1978. Alteration of the blood-retinal barrier in experimental diabetes mellitus. *Archives of ophthalmology*, 96(5), pp.878–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/655925> [Accessed July 5, 2014].
- Wang, F. & Javitt, J.C., 1996. Eye care for elderly Americans with diabetes mellitus. Failure to meet current guidelines. *Ophthalmology*, 103(11), pp.1744–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8942865> [Accessed June 14, 2014].

- Weinberger, D. et al., 1995. Non-retinovascular leakage in diabetic maculopathy. *The British journal of ophthalmology*, 79(8), pp.728–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=505232&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 24, 2014].
- White, N.H. et al., 2008. Prolonged effect of intensive therapy on the risk of retinopathy complications in patients with type 1 diabetes mellitus: 10 years after the Diabetes Control and Complications Trial. *Archives of ophthalmology*, 126(12), pp.1707–15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2663518&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 21, 2014].
- White, N.H. et al., 2010. Effect of prior intensive therapy in type 1 diabetes on 10-year progression of retinopathy in the DCCT/EDIC: comparison of adults and adolescents. *Diabetes*, 59(5), pp.1244–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2857905&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
- Wild, S. et al., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*, 27(5), pp.1047–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111519> [Accessed May 25, 2014].
- Wilkins, J.R. et al., 1996. Characterization of epiretinal membranes using optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 103(12), pp.2142–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9003350> [Accessed April 30, 2014].
- Wilkinson, C.P. et al., 2003. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. In *Ophthalmology*. pp. 1677–1682.
- Wilkinson-Berka, J.L., 2004. Vasoactive factors and diabetic retinopathy: vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and nitric oxide. *Current pharmaceutical design*, 10(27), pp.3331–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544519> [Accessed April 21, 2014].
- Will, J.C. et al., 1994. Patient adherence to guidelines for diabetes eye care: results from the diabetic eye disease follow-up study. *American journal of public health*, 84(10), pp.1669–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1615103&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2014].
- Williams, B. et al., 1997. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes*, 46(9), pp.1497–503. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287052> [Accessed April 16, 2014].
- Williams, G.A. et al., 2004. Single-field fundus photography for diabetic retinopathy screening: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*, 111(5), pp.1055–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121388> [Accessed June 14, 2014].
- Williams, R. et al., 1986. Assessment of non-mydriatic fundus photography in detection of diabetic retinopathy. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 293(6555), pp.1140–2.

- Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1341851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2014].
- Witmer, A.N. et al., 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in retinal and eye research*, 22(1), pp.1–29. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597922> [Accessed February 14, 2014].
- Wojtkowski, M. et al., 2003. Real-time in vivo imaging by high-speed spectral optical coherence tomography. *Optics letters*, 28(19), pp.1745–7. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514087> [Accessed June 1, 2014].
- Wojtkowski, M. et al., 2004. Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation. *Optics express*, 12(11), pp.2404–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19475077> [Accessed June 18, 2014].
- Wojtkowski, M. et al., 2005. Three-dimensional retinal imaging with high-speed ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 112(10), pp.1734–46. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1939719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 18, 2014].
- Wolf-Schnurrbusch, U.E.K. et al., 2009. Macular thickness measurements in healthy eyes using six different optical coherence tomography instruments. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(7), pp.3432–7. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234346> [Accessed April 30, 2014].
- WOLTER, J.R., 1961. Diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology*, 51, pp.1123–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13786453> [Accessed April 21, 2014].
- Wolter, J.R., 1981. The histopathology of cystoid macular edema. *Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie. Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 216(2), pp.85–101. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6910356> [Accessed May 12, 2014].
- Wong, A.C.M., Chan, C.W.N. & Hui, S.P., 2005. Relationship of gender, body mass index, and axial length with central retinal thickness using optical coherence tomography. *Eye (London, England)*, 19(3), pp.292–7. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258609> [Accessed May 2, 2014].
- Wong, K.C. & Wang, Z., 2006. Prevalence of type 2 diabetes mellitus of Chinese populations in Mainland China, Hong Kong, and Taiwan. *Diabetes research and clinical practice*, 73(2), pp.126–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16563548> [Accessed June 14, 2014].
- Wong, T.Y. et al., 2002. Cerebral white matter lesions, retinopathy, and incident clinical stroke. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 288(1), pp.67–74. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12090864> [Accessed February 21, 2014].
- Wong, T.Y. et al., 2006. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States. *American journal of ophthalmology*, 141(3), pp.446–455. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2246042&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Wright, A.D. & Dodson, P.M., 2011. Medical management of diabetic retinopathy: fenofibrate and ACCORD Eye studies. *Eye (London, England)*, 25(7), pp.843–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3178166&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 8, 2014].
- Wu, P.-C. et al., 2008. Assessment of macular retinal thickness and volume in normal eyes and highly myopic eyes with third-generation optical coherence tomography. *Eye (London, England)*, 22(4), pp.551–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17464309> [Accessed May 1, 2014].
- Wu, P.-C. et al., 2012. Optical coherence tomographic patterns in diabetic macula edema can predict the effects of intravitreal bevacizumab injection as primary treatment. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 28(1), pp.59–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21992557> [Accessed May 12, 2014].
- Wurm, A. et al., 2011. Purinergic signaling involved in Müller cell function in the mammalian retina. *Progress in retinal and eye research*, 30(5), pp.324–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689780> [Accessed July 3, 2014].
- Xia, P. et al., 1994. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, 43(9), pp.1122–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8070612> [Accessed March 20, 2014].
- Xia, P. et al., 1996. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *The Journal of clinical investigation*, 98(9), pp.2018–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=507645&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 15, 2014].
- Xie, X.W. et al., 2008. Prevalence and associated factors of diabetic retinopathy. The Beijing Eye Study 2006. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 246(11), pp.1519–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604548> [Accessed April 23, 2014].
- Yamamoto, S. et al., 2001. Morphological and functional analyses of diabetic macular edema by optical coherence tomography and multifocal electroretinograms. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 239(2), pp.96–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11372551> [Accessed May 4, 2014].
- Yang, Y. et al., 2003. A comparison of quantitative mapping and stereoscopic fundus photography grading of retinal thickness in diabetic eyes with macular edema. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye*, 34(1), pp.7–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569999> [Accessed April 25, 2014].

## Referências

- Yanoff, M. et al., 1984. Pathology of human cystoid macular edema. *Survey of ophthalmology*, 28 Suppl, pp.505–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6463850> [Accessed July 17, 2014].
- Yanyali, A. et al., 2011. Quantitative assessment of photoreceptor layer in eyes with resolved edema after pars plana vitrectomy with internal limiting membrane removal for diabetic macular edema. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 226(2), pp.57–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555906> [Accessed May 15, 2014].
- Yasukawa, T. et al., 1998. Quantitative analysis of foveal retinal thickness in diabetic retinopathy with the scanning retinal thickness analyzer. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 18, pp.150–155.
- Yau, J.W.Y. et al., 2012. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care*, 35(3), pp.556–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
- Yohannan, J. et al., 2013. Association of retinal sensitivity to integrity of photoreceptor inner/outer segment junction in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 120(6), pp.1254–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499060> [Accessed May 19, 2014].
- Yoshikawa, M. et al., 2013. Macular migration toward the optic disc after inner limiting membrane peeling for diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(1), pp.629–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23299482> [Accessed May 13, 2014].
- Zapata, M.A. et al., 2010. Insulin resistance and diabetic macular oedema in type 2 diabetes mellitus. *The British journal of ophthalmology*, 94(9), pp.1230–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542983> [Accessed April 29, 2014].
- Zeimer, R.C., Shahidi, M., et al., 1989. In vivo evaluation of a noninvasive method to measure the retinal thickness in primates. *Archives of ophthalmology*, 107(7), pp.1006–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2751453> [Accessed May 6, 2014].
- Zeimer, R.C., Mori, M.T. & Khoobehi, B., 1989. Feasibility test of a new method to measure retinal thickness noninvasively. *Investigative ophthalmology & visual science*, 30(10), pp.2099–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2793353> [Accessed May 6, 2014].
- Zeimer, R. et al., 1996. A new method for rapid mapping of the retinal thickness at the posterior pole. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(10), pp.1994–2001. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8814139> [Accessed May 6, 2014].
- Zeng, X.X., Ng, Y.K. & Ling, E.A., 2000. Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visual neuroscience*, 17(3), pp.463–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910112> [Accessed April 21, 2014].
- Zhang, S.X. et al., 2006. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic

retinopathy. *Journal of molecular endocrinology*, 37(1), pp.1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901919> [Accessed July 3, 2014].

Zhang, X. et al., 2010. Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 304(6), pp.649–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2945293&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 23, 2014].

Zou, H. et al., 2006. Quantitative in vivo retinal thickness measurement in chinese healthy subjects with retinal thickness analyzer. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(1), pp.341–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16384983> [Accessed May 7, 2014].