

Sílvia Nazaré Vilela Simão

# ALTERAÇÕES VASCULARES E NEURODEGENERESCÊNCIA NAS FASES INICIAIS DA RETINOPATIA DIABÉTICA: SEGUIMENTO DE DOIS ANOS

Dissertação de mestrado em Investigação Biomédica, orientada pela Professora Doutora Isabel Alexandra de Sousa Pires e pela Mestre Ana Rita Branco Marques Santos e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Julho de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Sílvia Nazaré Vilela Simão

Alterações Vasculares e  
Neurodegenerescência nas Fases  
Iniciais da Retinopatia Diabética:  
seguimento de dois anos

Dissertação de mestrado em Investigação Biomédica, orientada pela Professora Doutora Isabel Alexandra de Sousa Pires e pela Mestre Ana Rita Branco Marques Santos e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.



Trabalho realizado na Associação para a Investigação  
Biomédica e Inovação em Luz e Imagem (AIBILI).



## Agradecimentos

Ao finalizar esta etapa acadêmica, deixo algumas palavras, poucas, mas com sincero e profundo sentimento de gratidão e de reconhecimento para com as pessoas com as quais tenho o privilégio de aprender todos os dias.

Ao Professor Doutor José Cunha-Vaz, expresso a minha gratidão pelo seu saber, exigência científica, espírito crítico e pela excelência técnico-científica, e por acreditar no meu trabalho. Será sempre uma referência de excelência na minha formação.

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Alexandra de Sousa Pires, pela elevada competência na orientação, pelo apoio incondicional e pela confiança depositada em mim e no meu projeto de tese. O seu empenho e dedicação neste trabalho são de enaltecer, agradeço não só todos os ensinamentos e reflexões ímpares mas acima de tudo a disponibilidade evidenciada em todos os momentos.

À minha coorientadora, Mestre Ana Rita Branco Marques dos Santos, por toda a sua dedicação e profissionalismo desempenhados, pelo seu incentivo, apoio e disponibilidade constantes e pelas apreciações construtivas, que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Sem esquecer o companheirismo aos longo destes anos.

À Doutora Maria Luísa Ribeiro por acreditar nesta minha nova etapa, o mestrado, e dessa forma me ter entusiasmado a abraçar esta meta. Por acreditar no meu trabalho, por estar sempre presente em qualquer momento, pela partilha de todo o seu conhecimento muito para além da Oftalmologia, pelos conselhos de vida.

Aos meus colegas Pedro Melo, Mário Soares e Marta Lopes não só pela transmissão de conhecimentos, pelo desempenho prestado e colaboração na realização dos exames, mas acima de tudo pela amizade.

À Catarina Neves, ao Christian e ao Torcato pelo seu incansável trabalho, pela paciência e dedicação demonstradas neste projeto.

Aos meus Pais e irmãos, que sempre me apoiaram em todas as decisões que fiz ao longo da vida. Agradeço as oportunidades que me deram e o amor que sempre senti deles.

Ao Hugo, suporte das minhas emoções, um agradecimento especial pelo sorriso diário, pela compreensão, disponibilidade e incentivo constante, e por me fazer acreditar que posso ser capaz.

Muito Obrigada a todos!





## Resumo

A incidência de Diabetes Mellitus (DM) tem aumentado nos últimos anos, com tendência para crescer na próxima década. As suas complicações, micro e macrovasculares, emergem como uma das maiores ameaças à saúde em todo o mundo, com grandes custos económicos e sociais.

A Retinopatia Diabética (RD) é uma das principais complicações da DM. Apesar de avanços na metodologia de diagnóstico, que têm permitido elucidar melhor a sua fisiopatologia, e na aplicação de novas abordagens terapêuticas, a RD continua a ser a principal causa de cegueira em idade ativa nos países ocidentais <sup>(2-4)</sup>. A RD tem sido classicamente considerada como uma doença microvascular da retina. No entanto, evidências recentes sugerem que a neurodegeneração da retina é um evento precoce na patogénese da RD e que poderá preceder o desenvolvimento das anomalias microvasculares <sup>(5-7)</sup>.

É essencial compreender a fisiopatologia da RD, não só para a gestão da doença, mas também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A neurodegeneração retiniana em pacientes diabéticos é causada por mecanismos complexos, que incluem fatores oculares e sistémicos provocando alterações bioquímicas e celulares na retina.

A hiperglicemia, ao interromper o delicado ambiente metabólico da retina, reduz os sinais do recetor da insulina, essenciais para o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência neuronal, levando à apoptose neuronal <sup>(8)</sup>. Outros fatores moleculares, como o aumento do stresse oxidativo, a inflamação, a perda de fatores neuroprotetores e a excitotoxicidade do glutamato também contribuem para o processo de neurodegeneração <sup>(7, 9-11)</sup>.

A tomografia de coerência ótica *spectral domain* (SD-OCT) e o eletroretinograma multifocal (ERGmf) têm sido utilizados de forma crescente na prática e na investigação clínica como métodos não invasivos e objetivos para avaliar a estrutura e função da retina. Estruturalmente, através de recentes *software* de segmentação do SD-OCT, tem sido possível fazer uma análise quantitativa e qualitativa da espessura de todas as camadas da retina. Por outro lado, funcionalmente, o ERGmf, através da análise do perfil

da onda P1 (amplitude e tempo de latência), permite avaliar a resposta bioelétrica retiniana de forma localizada.

Desta forma, pretendeu-se com este trabalho identificar alterações neurodegenerativas retinianas em 73 doentes diabéticos, 30 sem lesões de RD (nível ETDRS 10) e 43 doentes com RDNP ligeira (nível ETDRS 20-35), utilizando o SD-OCT e o ERGmf, durante um período de dois anos.

Numa primeira análise (visita 1), observou-se, um maior tempo de latência e menor amplitude da onda P1 ( $p < 0.001$ ) nos doentes diabéticos sem RD e com RDNP ligeira, comparativamente ao grupo controlo. Diabéticos sem RD e com RDNP ligeira apresentaram menor espessura das camadas dos segmentos externos dos fotorreceptores ( $p < 0.001$ ) e fibras nervosas ( $p = 0.044$ ), e uma maior espessura da camada nuclear interna ( $p < 0.001$ ), com envolvimento das camadas adjacentes, observando-se um aumento de espessura das camadas plexiforme externa ( $p = 0.002$ ) e células ganglionares/plexiforme interna nos diabéticos com RDNP, comparativamente ao grupo controlo. Cinquenta e três por cento (53.3%) dos doentes sem RD e 58% dos diabéticos com RDNP ligeira apresentaram espessura de retina normal. Trinta por cento (30.0%) dos doentes com RDNP e 27.9% dos doentes com RDNP ligeira apresentaram espessura da retina acima dos valores normais ( $> 291.3 \mu\text{m}$ ). A espessura da camada nuclear interna parece ser a que mais contribui para esse aumento (em 78% e 92% dos doentes sem RD e com RDNP ligeira, respetivamente), verificando-se envolvimento das camadas adjacentes.

Após 24 meses de seguimento, observou-se nos diabéticos sem RD uma diminuição de espessura das camadas de células ganglionares ( $p = 0.001$ ) e nuclear interna ( $p = 0.013$ ), e diminuição do tempo de latência e aumento da amplitude da onda P1 ( $p > 0.05$ ), comparativamente a v1. No grupo ETDRS nível 20-35 observou-se diminuição das camadas da retina, com significância estatística na camada nuclear interna ( $p = 0.038$ ), e diminuição da amplitude da onda P1 na área foveal ( $p = 0.297$ ). Os diabéticos com RDNP apresentaram maior atraso no tempo de latência da onda P1 no anel 3 ( $p = 0.030$ ), em relação aos diabéticos sem RD.

O comprometimento neurovascular, observado neste estudo, parece estar envolvido em diferentes graus, em indivíduos diferentes, e sugere a existência de alteração da barreira hematorretiniana (BHR) e consequente acumulação de fluido extracelular na camada nuclear interna e camadas adjacentes, com perda de células

ganglionares, células bipolares e fotorreceptores, o que pode contribuir para a perda de visão nestes doentes.

### **Palavras-chave**

Retinopatia Diabética; Tomografia de Coerência Ótica; Eletrorretinografia Multifocal; Unidade Neurovascular; neurodegeneração retiniana



## Abstract

The incidence of Diabetes Mellitus (DM) has increased in recent years, with a tendency to grow in the next decade. Its complications, micro and macrovascular, emerge as one of the greatest threats to health around the world, with great economic and social costs.

Diabetic Retinopathy (DR) is one of the main complications of DM. Despite advances in diagnostic methodology that have led to a better elucidation of its pathophysiology, and in the application of new therapeutic approaches, DR remains the main cause of working-age blindness in the Western countries <sup>(2-4)</sup>. DR has been classically considered as a microvascular retinal disease. However, recent evidence suggests that retinal neurodegeneration is an early event in the pathogenesis of DR and may precede the development of microvascular lesions <sup>(5-7)</sup>.

It is essential to understand the pathophysiology of DR, not only for the management of the disease, but also for the development of new therapeutic strategies. Retinal neurodegeneration in diabetic patients is caused by complex mechanisms, which include ocular and systemic factors causing biochemical and cellular changes in the retina.

Hyperglycemia, by disrupting the delicate metabolic environment of the retina, reduces insulin receptor signals, which are essential for neuronal development, growth and survival, leading to neuronal apoptosis <sup>(8)</sup>. Other molecular factors such as increased oxidative stress, inflammation, loss of neuroprotective factors and glutamate excitotoxicity also contribute to neurodegeneration <sup>(7,9-11)</sup>.

Spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) and multifocal electroretinography (mfERG) have been increasingly used in practice and clinical research as non-invasive and objective methods for assessing retinal structure and function. Structurally, through recent SD-OCT segmentation software, it has been possible to make a quantitative and qualitative analysis of the thickness of all layers of the retina. On the other hand, functionally, the mfERG, through the analysis of the P1 waveform (amplitude and implicit time), allows to evaluate the retinal bioelectric response in a localized way.

Thus, it was intended with this work to identify retinal neurodegenerative changes in 73 diabetic patients, 30 patients without DR (ETDRS level 10) and 43 patients with mild

NPDR (non-proliferative diabetic retinopathy) (ETDRS levels 20-35), using SD-OCT and mfERG during two years.

In a first analysis (v1), a longer implicit time and a lower amplitude of the P1 ( $p < 0.001$ ) were observed in diabetic patients without DR or with mild NPDR, compared to the control group. Diabetics without DR or with mild NPDR showed thinning of the photoreceptor outer layer ( $p < 0.001$ ) and nerve fiber layer ( $p = 0.044$ ), and thickening of the inner nuclear layer ( $p < 0.001$ ), with involvement of the neighbour layers, with an increase of the outer plexiform ( $p = 0.002$ ) and ganglion cell/inner plexiform layers in diabetics with mild NPDR, compared to the control group. Fifty-three percent (53.3%) of patients without RD and 58% of patients with mild RDNP had normal retinal thickness. Thirty percent (30.0%) of patients without RD and 27.9% of patients with mild RDNP showed a retinal thickness above normal values ( $> 291.3\mu\text{m}$ ). The thickness of the inner nuclear layer appears to be the most contributor to this increase (showed in 78% of patients without RD and 92% of patients with mild RDNP), and shows an involvement of the neighbour layers.

After 24 months of follow-up, a decrease in the ganglion cell layer ( $p = 0.001$ ) and in the inner nuclear layer ( $p = 0.013$ ) was observed in diabetics without DR as well as a decrease in the implicit time of P1 wave and an increase in its amplitude ( $p > 0.05$ ), compared to visit 1. The ETDRS level 20-35 group showed a significant decrease in the inner nuclear layer thickness ( $p = 0.038$ ), and a decrease of the P1 amplitude in the foveal area ( $p = 0.297$ ). Diabetics with mild NPDR had a higher delay in P1 implicit time in ring 3 ( $p = 0.030$ ), compared to diabetics without DR.

Neurovascular impairment, observed in this study, appears to occur in different degrees in different patients, suggesting that the breakdown of the blood-retinal barrier (BHR) leads to accumulation of extracellular fluid in the inner nuclear layer and surrounding layers, with consequent loss of ganglion and bipolar cells and photoreceptors, which may contribute for future visual function impairment of these patients.

**Keywords:**

Diabetic retinopathy; Optical coherence tomography; Multifocal electroretinogram; Neurovascular complex; Retinal neurodegeneration.

## Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AIQ	Amplitude Interquartil
ANOVA	Análise de variância
AV	Acuidade visual
BHR	Barreira Hemato-retiniana
CCG	Camada de Células Ganglionares
CFN	Camada Fibras Nervosas
CNE	Camada Nuclear Externa
CNE/SIF	CNE/Segmento Interno dos Fotorreceptores
CNI	Camada Nuclear Interna
CORC	Coimbra Ophthalmology Reading Center
CPE	Camada Plexiforme Externa
CPI	Camada Plexiforme Interna
DAG	Diacilglicerol
DGS	Direção Geral de Saúde
DM	Diabetes Mellitus
DP	Desvio Padrão
EM	Edema Macular
EMCS	Edema Macular Clinicamente Significativo
EMD	EM Diabético
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
ERGmf	Eletrorretinograma Multifocal
ETDRS	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
FO	Fundoscopia
GAPDH	Gliceraldeído-3 Fosfato Desidrogenase
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
HE	Exsudados Duros
IC	Intervalo de Confiança
IE	Inferior Externo
IMC	Índice de Massa Corporal
IRMAs	Alterações Microvasculares Intrarretinianas
ISCEV	Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão
LI	Limite Inferior

LS	Limite Superior
MAs	Microaneurismas
MAVC	Melhor Acuidade Visual Corrigida
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NE	Nasal externo
NI	Nasal interno
OCT	Tomografia de Coerência Ótica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PARP	Poli (ADP-ribose) Polimerase
PFGA	Produtos Finais de Glicosilação Avançada
PIO	Pressão intraocular
PKC	Proteína Quinase C
PMA	Pressão Arterial Média
PREVADIAB	Estudo da Prevalência da Diabetes em Portugal
RD	Retinopatia Diabética
RDNP	Retinopatia Diabética Não Proliferativa
RDP	Retinopatia Diabética Proliferativa
RET	Retinografia
SD-OCT	OCT - <i>spectral domain</i>
SE	Exsudados Algodonosos
SE	Superior Externo
SEF	Segmento Externo dos Fotorreceptores
TE	Temporal Externo
TI	Temporal Interno
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VB	<i>Venous Beading</i>
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular



# Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	xi
Abreviaturas .....	xiii
Índice de Figuras.....	xvii
Índice de Tabelas.....	xxi
1. Introdução .....	1
1.1. Diabetes Mellitus .....	1
1.1.1. Definição e Prevalência da Diabetes Mellitus .....	1
1.1.2. Classificação da Diabetes Mellitus.....	2
1.1.3. Complicações Associadas à Diabetes Mellitus .....	3
1.1.4. Impacto económico da Diabetes Mellitus.....	4
1.2. Retinopatia Diabética .....	4
1.2.1. Definição e Prevalência da Retinopatia Diabética.....	4
1.2.2. Fatores de Risco da Retinopatia Diabética .....	5
1.2.3. Classificação clínica da Retinopatia Diabética .....	6
1.2.4. Neurodegeneração na Retinopatia Diabética.....	8
Mecanismos Moleculares .....	11
Inflamação .....	12
1.3. Métodos de Detecção e Avaliação da Retinopatia Diabética - Alterações Vasculares e Neurais.....	14
1.3.1. Retinografia .....	14
1.3.2. Eletrorretinograma multifocal .....	15
1.3.3. Tomografia de Coerência Ótica .....	18
2. Objetivo do presente trabalho .....	21
3. Métodos .....	23
3.1. Local de Execução e Desenho do Estudo .....	23
3.2. Amostra .....	24
3.3. Critérios de Inclusão e Exclusão.....	24
3.4. Cronograma .....	25
3.5. Procedimentos.....	26
3.5.1. História Clínica.....	27
3.5.2. Acuidade Visual .....	27
3.5.3. Eletrorretinograma multifocal .....	27

3.5.4.	Tomografia de Coerência Óptica .....	28
3.5.5.	Retinografia .....	32
4.	Análise Estatística.....	33
5.	Resultados.....	35
5.1.	Caracterização demográfica da Amostra.....	35
5.2.	Resultados do Eletrorretinograma multifocal .....	37
5.2.1.	Eletrorretinograma multifocal na Visita Inicial (v1).....	38
5.2.1.1.	Análise Global .....	38
5.2.1.2.	Análise por anéis .....	40
5.3.	Tomografia de Coerência Ótica na V1.....	43
5.3.1.	Espessura retiniana das camadas da retina no anel central .....	43
5.3.2.	Espessura das camadas da retina no anel interno na V1 .....	45
5.3.3.	Espessura das camadas da retina no anel externo na V1 .....	47
5.4.	Comparação da espessura das camadas da retina (SD-OCT) com os parâmetros funcionais (ERGmf) na área macular central .....	48
5.5.	Diferença do eletrorretinograma multifocal entre V2 e a V1.....	50
5.5.1.	Tempo de latência .....	50
5.5.2.	Amplitude.....	51
5.6.	Diferença na tomografia de coerência ótica entre V2 e V1 .....	52
5.6.1.	Diferença média de espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel central dos doentes diabéticos .....	52
5.6.2.	Diferença média de espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel interno dos doentes diabéticos .....	53
5.6.3.	Diferença média de espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel externo dos doentes diabéticos .....	54
5.7.	Correlações entre as variáveis analisadas .....	55
5.7.1.	Correlações no Grupo ETDRS nível 10 .....	55
5.7.2.	Correlações no Grupo ETDRS nível 20-35 .....	59
6.	Discussão .....	65
7.	Conclusões.....	73
8.	Perspetivas Futuras .....	75
9.	Referências.....	77
10.	Anexo .....	A-1

## Índice de Figuras

Figura 1 – Distribuição global de prevalência de DM em 2015 e projeção para 2040.....	2
Figura 2 – Retinografia do fundo do olho esquerdo de doente diabético com presença de microaneurismas, hemorragias e exsudados duros.....	7
Figura 3 – Organização do circuito retiniano. Encontram-se representados os Cones (C) e Bastonetes (R) na camada dos fotorreceptores; as células Horizontais (H), células Bipolares (B), células de Müller (M) e células Amácrinas (A) na camada plexiforme interna; e as células Ganglionares (G) mais internamente. Fonte: adaptado de “Functional circuitry of the retina” – Nature Reviews Neuroscience <sup>(1)</sup> .....	9
Figura 4 – Representação dos 7 campos ETDRS <i>standard</i> . ....	15
Figura 5 – Representação de uma resposta do ERGmf onde se pode observar as características principais da forma da onda bifásica. A seta vertical representa a amplitude de P1 e a horizontal o tempo de latência de P1. ....	16
Figura 6 – Representação do estímulo apresentado e resultado da resposta retiniana no ERGmf. ....	17
Figura 7 – Esquema representativo do princípio básico do SD-OCT.....	19
Figura 8 – Representação da morfologia da onda nos 103 hexágonos (imagem à esquerda) e representação dos 6 anéis concêntricos (imagem à direita). ....	28
Figura 9 – Protocolo de aquisição (Macular Cube 512x128 scans) da espessura média da retina e representação da espessura média nas nove áreas da grelha ETDRS. ....	30
Figura 10 – Representação da segmentação das camadas da retina, imagem devolvida pelo programa MATLAB. ....	31
Figura 11 – Representação das nove áreas da grelha ETDRS (imagem à esquerda) e da área central e os 2 anéis concêntricos (imagem à direita). C – centro; SI – superior interno; NI – nasal interno; II – inferior interno e TI – temporal interno; SE- superior externo; NE – nasal externo; IE – inferior externo; TE – temporal externo; Imagem à direita representa a área central (1mm); anel interno (3mm) e anel externo (6mm).....	31
Figura 12 – Representação gráfica do tipo <i>Box Plot</i> do tempo de latência (ms) da onda P1 nos diferentes grupos analisados. Resultados expressos em mediana (AIQ: Q1 – Q3). * $p<0.05$ – <i>Bonferroni</i> para comparações múltiplas.....	38
Figura 13 - Representação gráfica do tipo <i>Box Plot</i> da amplitude ( $nV/deg^2$ ) da onda P1 nos diferentes grupos analisados. Resultados expressos em mediana (AIQ: Q1 – Q3). * $p<0.05$ – <i>Bonferroni</i> para comparações múltiplas.....	39
Figura 14 – Representação do tempo de latência (ms) da onda de P1 por anel de excentricidade retiniana. ....	40
Figura 15 – Representação da amplitude ( $nV/deg^2$ ) da onda de P1 por anel de excentricidade retiniana. ....	42

Figura 16 – Representação gráfica da diferença média do tempo de latência (ms) de P1, $\pm 95\%$ IC, entre o grupo ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35 por anel. Significância testada com teste <i>t-Students</i> . .....	50
Figura 17 – Representação gráfica da diferença média da Amplitude (nV/deg <sup>2</sup> ) de P1, $\pm 95\%$ IC, entre o grupo ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35 por anel. Significância testada com teste <i>t-Students</i> . .....	51
Figura 18 – Representação gráfica da diferença média da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel central, com IC de 95% entre visitas nos grupos ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35. * $p < 0.05$ , teste <i>t-Student</i> . CFN – camada de fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI- camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa-segmento interno dos fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentado da retina. ....	52
Figura 19 – Representação gráfica da diferença média da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel interno, com IC de 95% entre visitas nos grupos ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35; * $p < 0.05$ , teste <i>t-Student</i> . CFN – camada de fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI- camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa-segmento interno dos fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentado da retina. ....	53
Figura 20 – Representação gráfica da diferença média da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel externo, com IC de 95% entre visitas nos grupos ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35. * $p < 0.05$ , teste <i>t-Student</i> . CFN – camada de fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI- camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa-segmento interno dos fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentado da retina. ....	54
Figura 21 – Correlação entre a duração da Diabetes Mellitus (DM) em anos e a espessura ( $\mu\text{m}$ ) do Epitélio Pigmentado da Retina na fóvea (imagem à esquerda) e na parafovea (imagem à direita), no grupo ETDRS nível 10, na v2.....	55
Figura 22 – Correlação entre a Hemoglobina Glicada (%) e a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear interna (CNI) na área foveal (imagem à esquerda). Correlação entre a Hemoglobina Glicada (%) e a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada de fibras nervosas (CFN) na área parafoveal (imagem à direita), no grupo ETDRS nível 10, na v2.....	56
Figura 23 – Correlação entre tempo de latência (ms) e a espessura ( $\mu\text{m}$ ) do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) na área foveal, no grupo ETDRS nível 10, na v2. ....	56
Figura 24 – Correlação entre o tempo de latência (ms) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/Segmento interno dos fotorreceptores (CNE/SIF) (imagem à esquerda) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) (imagem à direita) na área perifoveal, no grupo ETDRS nível 10, na v2. ....	57
Figura 25 – Correlação entre a amplitude (nV/deg <sup>2</sup> ) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem à esquerda) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/segmento interno fotorreceptores (CNE/SIF) (imagem à direita), na área parafoveal, no grupo ETDRS nível 10, na v2.....	57

Figura 26 – Correlação entre a amplitude (nv/deg <sup>2</sup> ) e a espessura (µm) da camada plexiforme externa (CPE) na área parafoveal, no grupo ETDRS nível 10, nav2. ....	58
Figura 27 – Correlação entre a amplitude (nv/deg <sup>2</sup> ) com a espessura (µm) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem à esquerda); com a espessura (µm) da camada nuclear interna (CNI) (imagem à direita) e com a espessura (µm) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores (CNE/SIF) (imagem em baixo),no grupo ETDRS nível 10 na v2.....	58
Figura 28 – Correlação entre duração da Diabetes Mellitus (DM) com o tempo de latência (ms) (imagem à esquerda) e com a espessura (µm) da camada plexiforme externa (CPE) (imagem à direita) na fóvea, no grupo ETDRS nível 20-35,na v2. ....	59
Figura 29 – Correlação entre duração da Diabetes Mellitus (DM) com a espessura (µm) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem à esquerda) e com a espessura (µm) da camada nuclear interna (CNI) no anel interno (imagem à direita), na área parafoveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2. ....	59
Figura 30 – Correlação entre duração da Diabetes Mellitus (DM) com a espessura (µm) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem à esquerda) e com a espessura (µm) da camada nuclear interna (CNI) (imagem à direita), na área perifoveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.....	60
Figura 31 – Correlação entre duração da Diabetes Mellitus (DM) com a espessura (µm) da camada de fibras nervosas (CFN) no anel externo, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2. ....	60
Figura 32 – Correlação entre hemoglobina glicada (HbA1c) com a espessura (µm) da camada plexiforme externa (CPE) (imagem à esquerda) e com a espessura (µm) da epitélio pigmentado da retina (EPR) no (imagem à direita), na área foveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.....	61
Figura 33 – Correlação entre hemoglobina glicada (HbA1c) com a espessura (µm) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores (CNI/SEF) (imagem à esquerda) e com a espessura (µm) do epitélio pigmentado da retina (EPR) (imagem à direita),na área pafoveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2. ....	61
Figura 34 – Correlação entre hemoglobina glicada (HbA1c) com a espessura (µm) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores (CNI/SEF) na área perifoveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.....	62
Figura 35 – Correlação entre o tempo de latência (ms) com a espessura (µm) da camada de fibras nervosas (CFN) (imagem à esquerda) na área foveal, e com a espessura (µm) do epitélio pigmentado da retina (EPR) na área parafoveal (imagem à direita), no grupo ETDRS nível 20-35 na v2.....	62
Figura 36 – Correlação entre amplitude (nV/deg <sup>2</sup> ) com a espessura (µm) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem superior esquerda), com a espessura (µm) da camada nuclear interna (CNI) (imagem superior direita) e com a camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores (CNE/SEF) (imagem inferior esquerda), na área parafoveal, e a espessura (µm) da camada nuclear interna (CNI) na área perifoveal, (imagem inferior direita), no grupo ETDRS nível 20-35, na v2. ....	63



## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Planeamento dos procedimentos realizados por visita .....	26
Tabela 2 – Escala ETDRS de Gravidade da Retinopatia Diabética .....	32
Tabela 3 – Características demográficas e clínicas por grupo diabético na V1 .....	36
Tabela 4 – Características Clínicas por grupo diabéticos na V2 .....	37
Tabela 5 – Espessura das camadas da retina ( $\mu\text{m}$ ) no anel central na V1, diferença média comparativamente ao grupo controlo .....	44
Tabela 6 – Valores da espessura ( $\mu\text{m}$ ) média das camadas individuais da retina no anel interior na v1, diferença média comparativamente ao grupo controlo. ....	46
Tabela 7 – Valores médios de espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas individuais da retina no anel externo na v1, diferença média comparativamente ao grupo controlo. ....	47
Tabela 8 – Espessura das camadas da retina ( $\mu\text{m}$ ) dos doentes diabéticos com mfERG alterado na área foveal, diferença média comparativamente ao grupo controlo. ....	49





# 1. Introdução

## 1.1. Diabetes Mellitus

### 1.1.1. Definição e Prevalência da Diabetes Mellitus

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define Diabetes Mellitus (DM) como uma doença metabólica caracterizada por um estado de hiperglicemia crónica, provocado por deficiência na produção ou ação de insulina e, em alguns casos, pela combinação de ambos os fatores.

Os critérios de diagnóstico da DM, de acordo com a norma DGS Nº 2/2001, de 14/01/2011 da Direção Geral de Saúde (DGS)<sup>(12)</sup>, são os seguintes:

- Glicemia em jejum  $\geq 126$  mg/dl (ou  $\geq 7.0$  mmol/l); ou
- Sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise de hiperglicemia associados a glicemia  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11.1$  mmol/l); ou
- Glicemia  $\geq 200$ mg/dl ( $\geq 11.1$  mmol/l) 2 horas após ingestão oral 75g de glicose; ou
- Hemoglobina glicada A1c (HbA1c)  $\geq 6.5\%$ .

A hiperglicemia crónica conduz a lesões, que podem ser graves, em vários sistemas do organismo, especialmente os nervos e vasos sanguíneos<sup>(13)</sup>.

Ao longo dos últimos anos, a DM tem sido vista como um problema de saúde pública, sendo uma das doenças mais comuns em todo o mundo. Segundo a OMS, até ao final de 2015, 9.0% da população mundial adulta ( $\geq 18$  anos) estava afetada pela doença, estimando-se que em 2040 a DM possa ser a 7ª causa de morte no mundo. O aumento do número de diabéticos pode ser de cerca de 55.0% em relação à população atualmente atingida pela doença, sendo este aumento mais evidente nos países em desenvolvimento<sup>(14)</sup> (Figura 1). Este facto irá provocar um aumento exponencial de custos para os sistemas de saúde.

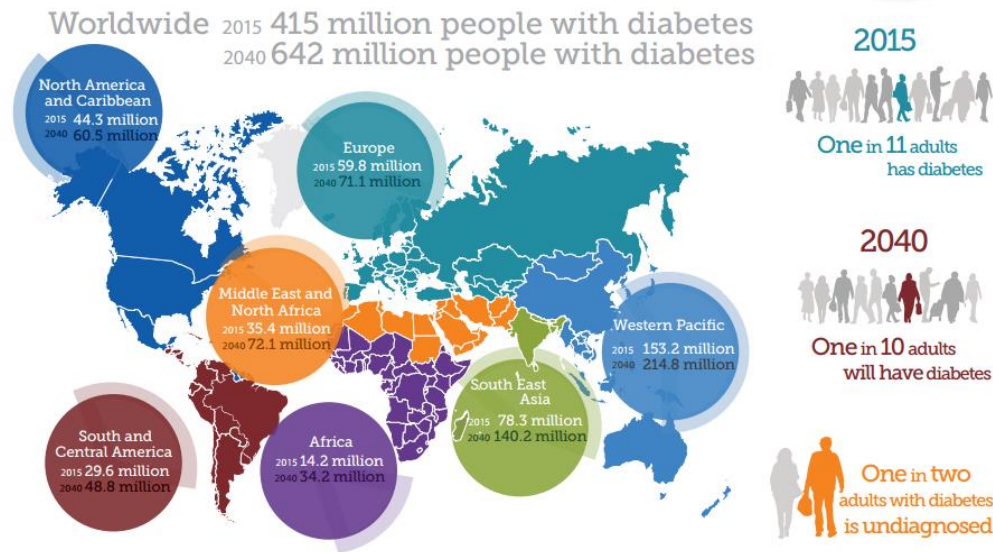


Figura 1 – Distribuição global de prevalência de DM em 2015 e projeção para 2040.

Na Europa, na população entre 20 e 70 anos, a prevalência média de DM em 2015 foi de cerca de 8.0%, 10.3% nos homens e 9.6% nas mulheres<sup>(14, 15)</sup>.

Em Portugal, de acordo com o estudo PREVADIAB, que decorreu entre 2008 e 2009, a prevalência da DM foi de 11.7%, no grupo etário 20-79 anos, com diferença significativa entre homens e mulheres (14.2% e 9.5% respetivamente). A doença estava diagnosticada em 7.4% dos casos, e 27.2% da amostra apresentava hiperglicemia intermédia<sup>(16)</sup>. Segundo o relatório anual do Observatório Nacional da Diabetes, em 2015 a prevalência da DM foi de 13.3%, 15.9% nos homens e 10.9% nas mulheres entre os 20 e os 79 anos, sendo o grupo etário dos 65-74 anos aquele que detinha maior percentagem de doentes – 23.8%. Existiam mais de 1 milhão de doentes diabéticos na população portuguesa<sup>(17)</sup>.

Outros indicadores com evolução preocupante são o aumento do número de internamentos associados à DM e o aumento da diabetes gestacional, bem como, o aumento da despesa com medicamentos<sup>(17)</sup>.

### 1.1.2. Classificação da Diabetes Mellitus

A DM pode ser classificada em três tipos: tipo 1, tipo 2 e diabetes gestacional, conforme a sua fisiopatologia.

A DM tipo 1 caracteriza-se pela destruição autoimune das células- $\beta$  dos Ilhéus de Langerhans do pâncreas e conseqüente não produção de insulina, levando ao aumento da concentração de glicose na corrente sanguínea (hiperglicemia) <sup>(14, 18)</sup>. A DM tipo 1 é menos frequente que a DM tipo 2 (menos de 10.0% dos casos de diabetes), contudo a sua incidência está a aumentar <sup>(17)</sup>.

A DM tipo 2 é caracterizada pela resistência à insulina por parte das células dos tecidos, isto é, a diminuição da sensibilidade dos tecidos aos efeitos metabólicos da insulina, e por falhas na secreção de insulina, podendo qualquer uma das alterações ser predominante <sup>(19)</sup>. É o tipo mais comum da doença, ocorrendo em 90% a 95% dos casos. Verifica-se ocorrência de hiperglicemia, podendo também ocorrer níveis elevados de insulina no sangue (hiperinsulinemia) <sup>(18)</sup>. Ao contrário da DM tipo 1, as causas da doença não são de carácter autoimune. Embora o mecanismo não seja ainda completamente conhecido, as principais causas para a resistência à insulina são a obesidade e o excesso de gordura visceral, normalmente associadas a predisposição genética para a falha na produção de insulina e resistência à insulina. O aumento da prevalência da DM tipo 2 está associado a mudanças culturais e sociais, ao envelhecimento da população, ao estilo de vida não saudável, bem como, a outros padrões comportamentais <sup>(13, 19, 20)</sup>.

A diabetes gestacional refere-se à intolerância aos hidratos de carbono que resultam em hiperglicemia de gravidade variável e que tem início, ou é descrita pela primeira vez, durante a gravidez <sup>(19)</sup>.

### **1.1.3. Complicações Associadas à Diabetes Mellitus**

Os efeitos da DM a longo prazo incluem lesão, disfunção e falência de vários órgãos, sendo uma causa significativa de morbidade e mortalidade. Os doentes com DM têm maior suscetibilidade a infeções, mas também com maior frequência patologias crónicas, como a aterosclerose, disfunção renal e doenças do sistema nervoso, como a neuropatia diabética, conseqüência dos efeitos tóxicos da hiperglicemia. Constitui ainda uma importante causa de morte, devido ao risco aumentado de doença coronária e de acidente vascular cerebral <sup>(18)</sup>. Foi estimado que a elevada concentração de glicose no sangue pode reduzir até cerca de 18 anos a esperança média de vida do doente <sup>(17)</sup>.

A DM é a principal causa de cegueira nos países desenvolvidos <sup>(15, 20)</sup>. No olho, a exposição das células insulino-independentes da retina a altos níveis de glicose por um longo período de tempo, provoca um aumento da concentração de glicose no interior destas células <sup>(21)</sup>, conduzindo ao aparecimento da retinopatia diabética (RD) e, em alguns doentes, às complicações que ameaçam a visão: o edema macular (EM) e a retinopatia diabética proliferativa (RDP).

#### **1.1.4. Impacto económico da Diabetes Mellitus**

À medida que a incidência e prevalência da DM aumentam, o impacto económico nos cuidados de saúde e na produtividade dos indivíduos e famílias é significativo <sup>(14)</sup>.

Em 2014 a diabetes, em Portugal, representou um custo direto estimado entre 1 300 e 1 550 milhões de euros, um acréscimo aproximado de 50 milhões face ao ano anterior. Representando um custo de 1 540 milhões de euros por indivíduo, valores que representam cerca de 1% do produto interno bruto e 10% das despesas em saúde <sup>(17)</sup>. Os utentes do Sistema Nacional de Saúde têm encargos diretos de 20.6 milhões de euros com o consumo de antidiabéticos orais e insulinas, fármacos usados no tratamento da DM.

## **1.2. Retinopatia Diabética**

### **1.2.1. Definição e Prevalência da Retinopatia Diabética**

A RD é uma complicação frequente da DM, sendo uma das principais causas de perda visual e cegueira na população ativa em todo o mundo <sup>(2-4)</sup>.

O número absoluto de pessoas com RD é alarmante. De acordo com a OMS, estima-se que a RD represente 4.8% do número de casos de cegueira (37 milhões) em todo o mundo <sup>(15)</sup>.

Uma meta-análise realizada por Yau *et al*, em 2012, mostrou que a prevalência global da RD em indivíduos com DM tipo 1 e tipo 2 era de 34.6%, dos quais 10% apresentavam uma forma da doença que ameaça a visão (EM Diabético e/ou RDP) <sup>(4, 22)</sup>.

A prevalência de RD é menor em Asiáticos (19.9%) comparando com os Caucásios (45.7%), Afro-Americanos (49.6%) e os Hispânicos (34.6%) <sup>(23, 24)</sup>.

Em Portugal num estudo realizado por Dutra Medeiros *et al* em 2015 - RETINODIAB *Study*, foram detetados 8 584 doentes com RD (16.3%).

A prevalência da RD associada à diabetes tipo 2 é superior à que se verificana diabetes tipo 1, devido à maior prevalência da diabetes tipo 2 na população. No entanto, devido à idade mais precoce de aparecimento da diabetes, e por conseguinte maior tempo de duração da doença, a prevalência da RD nos diabéticos tipo 1 é elevada, superior a 90% após 15 anos de duração de doença <sup>(25, 26)</sup>.

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 <sup>(27-29)</sup>. De acordo com alguns autores, as alterações neuronais e apoptose neuronal podem preceder o aparecimento das lesões vasculares <sup>(25, 30, 31)</sup>.

### **1.2.2. Fatores de Risco da Retinopatia Diabética**

Vários fatores de risco podem influenciar o desenvolvimento e progressão da RD, de acordo com estudos epidemiológicos <sup>(2, 4, 32)</sup>. Há fatores sobre os quais não se pode exercer influência, tais como o sexo, a genética do indivíduo e a duração da DM. Os fatores de risco modificáveis são o controlo metabólico, a hipertensão arterial e o estilo de vida.

Existe um consenso geral de que a duração da DM e o controlo metabólico são os principais fatores de risco para a evolução da RD, sendo o controlo glicémico o fator modificável mais importante <sup>(32-41)</sup>.

A hipertensão arterial e a dislipidemia são co-morbilidades frequentemente associadas à DM, e o seu controlo é defendido na literatura, para evitar o desenvolvimento e progressão das complicações microvasculares <sup>(42)</sup>.

Outro fator modificável é o estilo de vida dos indivíduos, como o sedentarismo a falta de atividade física, o tabagismo e o consumo de dietas hipercalóricas.

A influência da genética pode explicar parte da heterogeneidade no desenvolvimento da RD <sup>(43)</sup>. Múltiplos estudos têm demonstrado que fatores genéticos podem desempenhar um papel importante na determinação do risco de um indivíduo desenvolver RD e de esta progredir para formas mais graves. Efetivamente, existem doentes diabéticos que desenvolvem RD apesar da curta duração da DM e/ou excelente controlo metabólico; por outro lado, há doentes diabéticos que não desenvolvem RD, apesar de hiperglicemias crónicas e/ou duração mais prolongada da doença <sup>(2, 4, 44, 45)</sup>.

### **1.2.3. Classificação clínica da Retinopatia Diabética**

A classificação clínica da RD baseia-se nas alterações estruturais da microvasculatura retiniana observadas clinicamente <sup>(46-48)</sup>. Em 2003 um grupo internacional de especialistas propôs escalas independentes para classificação da gravidade da RD e do EMD, com o objetivo de melhorar o rastreio de doentes com RD e facilitar a comunicação e a transferência de informação entre médicos <sup>(49)</sup>. Esta escala de gravidade da RD considera cinco níveis:

- Sem RD;
- RD não proliferativa (RDNP) ligeira;
- RDNP moderada;
- RDNP grave;
- RD proliferativa (RDP) <sup>(49)</sup>.

Na fase de RD pré-clínica, caracterizada por ausência de lesões na fundoscopia, as alterações patológicas 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 <sup>(50, 51)</sup>. Esta fase é também caracterizada

pela perda de pericitos da parede vascular e espessamento da membrana basal <sup>(51)</sup>. Estas alterações cursam com uma alteração da BHR interna <sup>(48)</sup>.

A RDNP caracteriza-se por anomalias vasculares, tais como MAs e hemorragias intra-retinianas, primeiras lesões observadas na fundoscopia; dilatação venosa e exsudatos duros (depósitos lipídicos intrarretinianos) e moles (manchas algodonosas). O EM parece resultar de alteração da permeabilidade vascular nos capilares da retina por rotura da BHR interna <sup>(52)</sup>; a isquemia da retina surge na sequência da diminuição de



Figura 2 – Retinografia do fundo do olho esquerdo de doente diabético com presença de microaneurismas, hemorragias e exsudatos duros.

capilares perfundidos ou da sua oclusão <sup>(53, 54)</sup> (figura 2).

À medida que a RD progride, há um estreitamento gradual dos vasos retinianos que resulta em diminuição da perfusão e isquemia da retina. Os sinais clínicos de aumento da isquemia incluem o aparecimento de anomalias venosas (dilatação, *venous beading, loops*), alterações microvasculares intrarretinianas (IRMAs), aumento do número e tamanho de hemorragias retinianas e das manchas algodonosas.

A RDP é caracterizada pela presença de neovasos na superfície interna da retina induzida por uma isquemia retiniana mais global. Novos vasos sobre ou perto do disco Ótico e novos vasos em qualquer parte da retina são propensos a sangrar, resultando em hemorragia vítrea. Estes novos vasos podem, também, sofrer fibrose e

contração, podendo surgir tração vitreoretiniana e descolamento retiniano tracional ou regmatogéneo.

O EM pode complicar e ser aparente em qualquer fase da RD, desde as mais precoces, embora a prevalência aumente com o aumento da gravidade da RD <sup>(55)</sup>. Surge como consequência do extravasamento de água e macromoléculas, que ocorre através de uma BHR interna disfuncional, uma alteração precoce na doença retiniana associada à diabetes <sup>(52)</sup>, e é considerado a principal causa de perda de acuidade visual (AV) na DM <sup>(27, 28)</sup>. O EM é definido como um aumento da espessura da retina na área macular central por acumulação de fluido no tecido retiniano. Mais estritamente, o *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) definiu EM clinicamente significativo (EMCS) como um espessamento retiniano, com ou sem exsudatos duros adjacentes, que envolvem o centro da mácula ou ameaçam envolvê-lo. No estudo ETDRS, o tratamento do EMCS com laser focal reduziu para metade o risco de perda moderada de AV <sup>(56)</sup>.

#### **1.2.4. Neurodegeneração na Retinopatia Diabética**

A retina é uma estrutura neuro-sensorial constituída por três camadas de corpos de células nervosas e duas camadas de sinapses <sup>(1)</sup> (Figura 3). A camada nuclear externa (CNE) contém os corpos celulares dos bastonetes e cones, a camada nuclear interna (CNI) contém os corpos celulares das células bipolares, horizontais e amácrinas e a camada de células ganglionares (CCG) contém corpos celulares das células ganglionares e de células amácrinas deslocadas. A divisão e comunicação entre estas camadas de células nervosas é feita nas camadas plexiformes onde ocorrem as sinapses:

- Camada plexiforme externa (CPE) - sinapses entre os fotorreceptores e as células bipolares (orientadas verticalmente) e células horizontais (orientadas horizontalmente),

- Camada plexiforme interna (CPI) - funciona como uma estação retransmissora para as células nervosas portadoras de informação vertical (células bipolares) para se conectarem às células ganglionares.

Para além destas camadas plexiformes, diferentes variedades de células amácrinas dirigidas horizontal e verticalmente interagem noutras redes para influenciar e



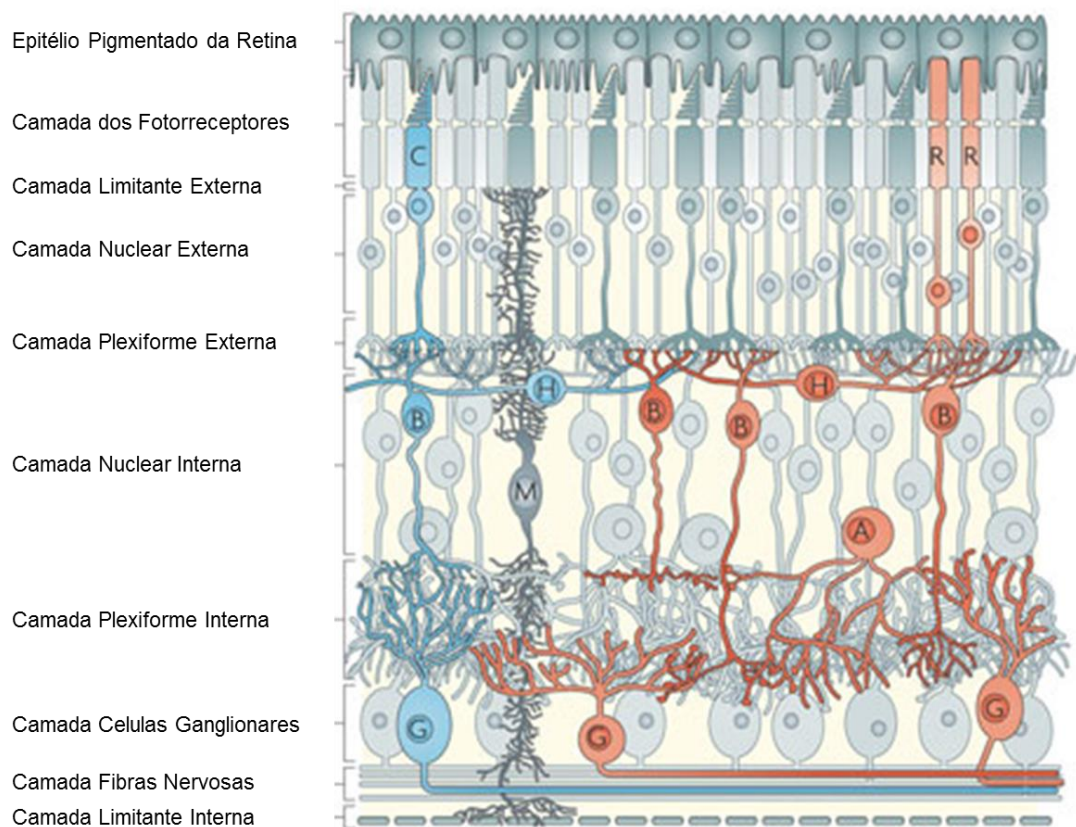


Figura 3 – Organização do circuito retiniano. Encontram-se representados os Cones (C) e Bastonetes (R) na camada dos fotorreceptores; as células Horizontais (H), células Bipolares (B), células de Müller (M) e células Amácrinas (A) na camada plexiforme interna; e as células Ganglionares (G) mais internamente. Fonte: adaptado de "Functional circuitry of the retina" – Nature Reviews Neuroscience <sup>(1)</sup>.

integrar os sinais das células ganglionares. É no culminar deste processamento neural na CPI que a mensagem sobre a imagem visual formada nos fotorreceptores é transmitida através de células ganglionares para o cérebro ao longo do nervo ótico.

Para além das alterações vasculares, a retina neurosensorial está alterada na diabetes <sup>(5, 28, 29)</sup>.

Efetivamente, evidências recentes sugerem que a RD envolve alterações em todos os elementos celulares da retina, incluindo as células do endotélio vascular e pericitos, células da glia (macroglia e microglia) <sup>(28, 51)</sup> e neurónios (fotorreceptores, células bipolares, células amácrinas e células ganglionares), com consequente alteração

da espessura das diferentes camadas da retina, detetável nas fases iniciais da RD, ou mesmo em fases de RD pré-clínica <sup>(28)</sup>.

Tem sido defendido na literatura que a disfunção da retina associada à diabetes deve ser considerada uma alteração que afeta inicialmente diferentes componentes da unidade neurovascular da retina, em diferentes doentes <sup>(27, 28)</sup>. 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 <sup>(28)</sup>. Esta 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 <sup>(57)</sup>. O fato de que o tratamento das complicações vasculares na retina preserva a AV em doentes com RD realça a interligação da retina neuronal com a retina vascular e a unidade neurovascular funcional na retina <sup>(28)</sup>.

Os componentes da unidade neurovascular parecem ser envolvidos em diferentes graus, em indivíduos diferentes <sup>(27)</sup>. Nem todos os doentes apresentam uma alteração detetável da BHR nas fases iniciais da doença <sup>(58)</sup>, e nem todos os doentes apresentam alterações eletrofisiológicas na mesma fase da doença <sup>(59, 60)</sup>.

Na retina, a ação da insulina estimula o desenvolvimento neurológico, a diferenciação, o crescimento e a sobrevivência celular através do suporte trófico aos neurónios retinianos. A apoptose dos elementos celulares da retina pode ser evitada pela terapia de insulina sistêmica, no caso particular da DM <sup>(8)</sup>.

A neurodegeneração retiniana tem sido descrita como uma consequência da apoptose neuronal, da gliose reativa, da excitotoxicidade do glutamato, da diminuição dos fatores neuroprotetores e do comprometimento do acoplamento neurovascular <sup>(5, 7, 25, 30, 61, 62)</sup>.

As células gliais que existem na retina são as células de Müller e os astrócitos, integram a atividade neuronal e vascular na retina <sup>(63)</sup>, e parecem estar disfuncionais na DM <sup>(64)</sup>. 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 <sup>(65)</sup>.

As células gliais regulam o metabolismo do glutamato (o principal neurotransmissor) e a atividade sináptica na retina interna <sup>(65)</sup>. Na DM este processo está precocemente alterado, resultando em acumulação de excesso de glutamato, que se pode associar a excitotoxicidade e degeneração neuronal <sup>(7, 66)</sup>. A hiperglicemia compromete o metabolismo do glutamato alterando as suas enzimas, o que provoca uma redução na atividade dos transportadores de glutamato nas células de Müller, levando ao aumento de concentração de glutamato no fluido extracelular <sup>(7)</sup>.

Em resumo, alguns autores têm considerado a RD uma doença ocular neurodegenerativa, para além de uma doença microvascular <sup>(7)</sup>.

### **Mecanismos Moleculares**

Na fisiopatologia da RD têm sido implicadas diversas vias intracelulares, ativadas pela hiperglicemia <sup>(65, 67)</sup>. Estas vias moleculares estarão provavelmente interligadas num complexo fenómeno fisiopatológico, e incluem o aumento do fluxo de glicose através das vias do poliol e da hexosamina, a ativação da proteína quinase C (PKC) e a acumulação de produtos finais de glicosilação avançada (PFGA) <sup>(68, 69)</sup>. Estes diferentes mecanismos poderão ser ativados por um evento inicial, único, induzido pela hiperglicemia, e que parece ser a excessiva produção de espécies reativas de oxigénio, e especialmente o anião superóxido, pela cadeia respiratória mitocondrial <sup>(9, 70)</sup>.

- A via do poliol depende da enzima aldose redutase. Quando a concentração intracelular de glicose se torna elevada, a aldose redutase reduz a glicose a sorbitol (que depois é oxidada a frutose), num processo que consome o cofator NADPH, essencial para regenerar a glutathione reduzida <sup>(71)</sup>, o que reduz a resposta das células da retina ao stresse oxidativo <sup>(9)</sup> através da diminuição do funcionamento das células ganglionares, células de Müller, pericitos e células endoteliais da retina <sup>(72)</sup>.

- Os PFGA resultam da interação entre açúcares redutores e resíduos de amina em proteínas, lípidos ou ácidos nucleicos, após uma série de reações complexas (rearranjos, desidratações e condensações). Estas substâncias acumulam-se nas células vasculares, nos neurónios e na glia <sup>(73)</sup>. Alguns estudos demonstraram que os produtos finais de glicosilação avançada têm capacidade de induzir apoptose (através da ativação da caspase-3) nas camadas de células ganglionares e nuclear externa <sup>(74)</sup>.

- A PKC está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. A hiperglicemia induz a síntese de novo de diacilglicerol (DAG), com consequente ativação de várias isoformas da PKC, que têm sido associadas à disfunção vascular, bem como a diversas anomalias, estruturais e celulares, que ocorrem na RD, tais como, o aumento do fluxo sanguíneo, espessamento da membrana basal, expansão da matriz extracelular, aumento da permeabilidade vascular, apoptose de células retinianas, angiogênese, adesão leucocitária e ativação de citocinas <sup>(75, 76)</sup>.

- A via da hexosamina é ativada como alternativa à glicólise para utilizar a frutose-6-fosfato que é produzida em excesso devido à hiperglicemia. A ativação desta via foi associada com a apoptose de células endoteliais e neuronais da retina e com a limitação da proliferação de pericitos <sup>(77)</sup>.

- O stresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes <sup>(78)</sup>.

A hipótese do mecanismo “unificador”, para explicar a patogenia da doença microvascular diabética foi proposta por Brownlee <sup>(9)</sup>. Assim, a hiperglicemia intracelular provoca aumento da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio. Estas, por sua vez, provocam quebras nas cadeias de ADN 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 <sup>(79)</sup>, o que reduz a sua atividade e aumenta todos os intermediários da via glicolítica. A ativação da PARP tem ainda como consequência o aumento da caspase-3 e a diminuição de alguns fatores de neuroproteção, como é o caso do fator neurotrófico derivado do cérebro e da glutamina sintetase. Na RD a expressão desta enzima encontra-se aumentada nas camadas de células ganglionares e nuclear interna <sup>(77, 80)</sup>.

## **Inflamação**

Outro componente com um papel significativo na patogênese da RD é a inflamação. A inflamação é uma resposta não específica a uma agressão, através de uma variedade de mediadores moleculares e funcionais, e que inclui o recrutamento e/ou ativação de leucócitos nas células endoteliais <sup>(81)</sup>. Juntamente com os compostos

resultantes do stresse oxidativo, contribui também para a morte celular e amplificação da resposta inflamatória retiniana <sup>(11)</sup>. Promove a ativação da microglia, que produz citocinas inflamatórias <sup>(82)</sup>, que induzem a adesão de moléculas e consequente acumulação de neutrófilos no endotélio e extravasamento de macrófagos <sup>(83)</sup>.

A inflamação crónica caracteriza-se por aumento da permeabilidade vascular, edema, infiltração celular, libertação de citocinas, destruição tecidual, neovascularização e tentativa de reparação <sup>(84)</sup>. Os processos fisiológicos de reparação, que auxiliam as células retinianas na sobrevivência ao stresse, incluem a libertação de fatores de crescimento e citocinas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de necrose tumoral (TNF) <sup>(85)</sup>.

O VEGF é uma proteína com ação a nível do aumento da permeabilidade vascular, por rutura da BHR, de que resulta edema da retina, e na migração e proliferação celular, durante a angiogénese <sup>(86)</sup>.

Por sua vez, o TNF- $\alpha$  promove o aumento de moléculas de adesão, recrutamento de leucócitos, indução de apoptose, aumento da transcrição de fatores de crescimento e de outros mediadores inflamatórios <sup>(87)</sup>.

O aumento da libertação de citocinas pode servir como função adaptativa para manter a função neuronal mas, ao mesmo tempo, tornar-se mal adaptativa, com lesão vascular progressiva resultando em edema e neovascularização <sup>(88)</sup>. O aumento dos mediadores e a decorrente leucostase têm como consequência a lesão direta e morte de células endoteliais, bloqueio de capilares, rutura de *tight-junctions* endoteliais e aumento da permeabilidade vascular, mediada pela expressão aumentada de VEGF <sup>(87)</sup>. Deste modo, este ciclo vicioso perpetua tanto a lesão vascular como a neuronal, e culmina nas características clínicas da RD, verificando-se uma relação causal com o desenvolvimento do aumento da permeabilidade e degeneração de capilares retinianos <sup>(88)</sup>.

Em resumo, as alterações da BHR, a lesão neuronal e a inflamação parecem ser as alterações mais relevantes que ocorrem nas fases iniciais da doença retiniana na diabetes <sup>(27)</sup>. A alteração das células gliais parece contribuir para o aumento da permeabilidade da BHR <sup>(89)</sup>.

### **1.3. Métodos de Detecção e Avaliação da Retinopatia Diabética - Alterações Vasculares e Neuronais**

A deteção precoce da RD e das suas complicações é muito importante para um tratamento atempado e eficaz, pois, quanto maior a sua gravidade, pior é o prognóstico visual e resultado do tratamento <sup>(56)</sup>.

O exame oftalmológico completo, incluindo a avaliação da acuidade visual, biomicroscopia e oftalmoscopia (direta ou indireta), e a documentação fotográfica sob midríase farmacológica são fundamentais para a deteção e avaliação da gravidade das lesões de RD.

A RD é classicamente classificada segundo as alterações microvasculares fundoscopicamente observadas na retina, sendo a fotografia a cores do fundo ocular (retinografia) uma referência necessária para o seu estadiamento. Contudo, a avaliação de parâmetros estruturais, como a alteração da espessura das diferentes camadas da retina, observada na Tomografia de Coerência Ótica (OCT), e de alterações funcionais, avaliadas pelo Eletrorretinograma multifocal (ERGmf), apoiam o conceito de uma diferente abordagem nas fases precoces da RD enquanto doença neurodegenerativa.

A neuropatia retiniana observada em pacientes com DM sem RD clinicamente visível é corroborada por estudos funcionais que têm demonstrado défices funcionais neurorretinianos, como a diminuição à adaptação ao escuro e da sensibilidade ao contraste, a perda de discriminação cromática, alteração nos campos visuais e alterações na resposta bioelétrica da retina, evidenciada no eletrorretinograma <sup>(90-95)</sup>.

No entanto, ainda não está claro se a neurodegeneração retiniana é um fator independente ou uma microangiopatia diabética <sup>(30)</sup>. O OCT e o ERGmf são atualmente ferramentas importantes para detetar alterações estruturais e funcionais, respetivamente, decorrentes da neurodegeneração retiniana.

#### **1.3.1. Retinografia**

A retinografia é um método não invasivo que permite detetar, documentar e monitorizar a presença de lesões retinianas ao longo do tempo. Utiliza uma câmara de

fundo, um microscópio especializado de baixa potência com uma câmara anexa, concebida para fotografar a superfície posterior do olho.

No estudo ETDRS, que decorreu nas décadas de 80/90, a classificação de RD foi baseada na análise de pares estereoscópicos de retinografias realizadas a 30° e obtidas em 7 campos do fundo ocular <sup>(46)</sup> (figura 4). Cerca de 25 sinais de RD eram quantificados, escalados por gravidade em cada campo, através da comparação com fotografias *standard*. São descritos níveis de gravidade crescente, que vão desde a ausência de lesões de RD à presença de RDP avançada. Este método de avaliação é sensível, específico, reproduzível e bastante utilizado em estudos clínicos prospetivos, contudo demasiado complexo para a prática clínica diária, na qual se recorre à classificação internacional de 2003 <sup>(49)</sup>.

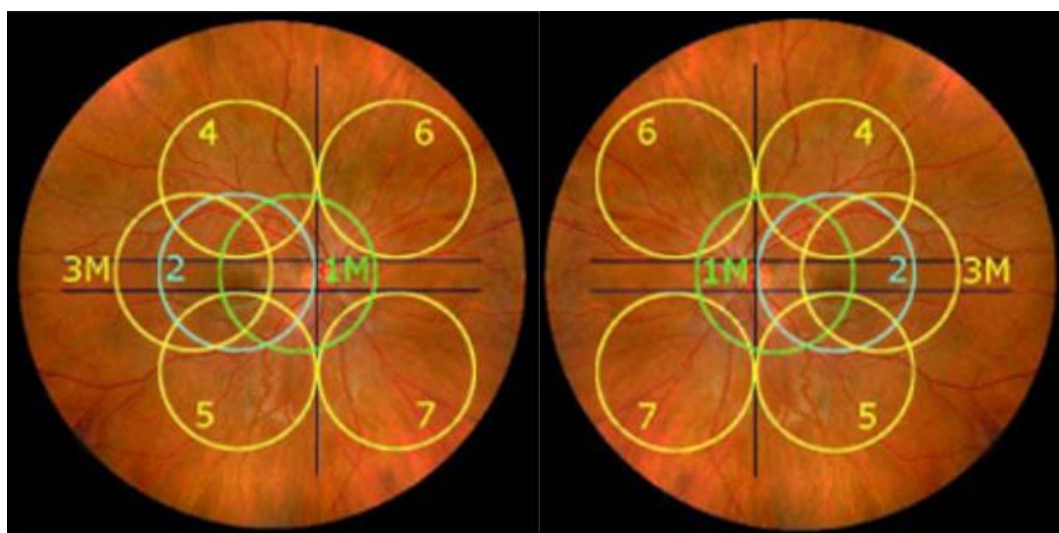


Figura 4 – Representação dos 7 campos ETDRS *standard*.

### 1.3.2. Eletrorretinograma multifocal

O ERGmf é uma técnica não-invasiva, desenvolvida em 1992 por Sutter e Tran <sup>(96)</sup>, que permite avaliar a atividade elétrica da retina central (45° centrais) em diferentes localizações. Para tal, usa uma sequência-m binária pseudo-aleatória gerando uma representação topográfica da atividade localizada das células bipolares e dos cones em

condições de adaptação à luz. Do registo contínuo é derivada uma série de respostas para cada um dos hexágonos que constituem o estímulo. Essas respostas denominam-se *Kernels*, e usualmente são utilizados para análise os *Kernels* de primeira (K1) e de segunda ordem. A extração dos *Kernels* é obtida através da correlação cruzada entre o registo contínuo e uma sequência derivada da sequência-m<sup>(97, 98)</sup>. A forma típica da onda da resposta básica do ERGmf (K1) é uma onda bifásica com uma deflexão negativa (N1) seguida por um pico positivo (P1). Geralmente há uma segunda deflexão negativa (N2) após o pico positivo (Figura 5), de acordo com a polaridade e ordem de aparência. Estes três picos denominam-se N1, P1 e N2, respetivamente. As medidas padrão analisadas no ERGmf são a amplitude e o tempo de latência da onda P1<sup>(99)</sup>.

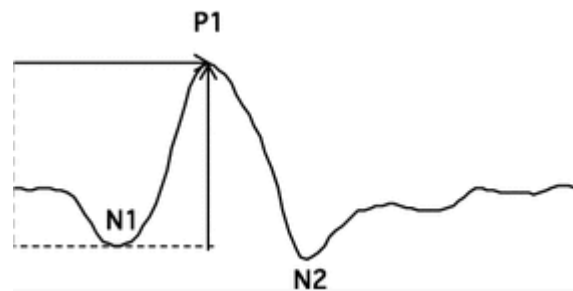


Figura 5 – Representação de uma resposta do ERGmf onde se pode observar as características principais da forma da onda bifásica. A seta vertical representa a amplitude de P1 e a horizontal o tempo de latência de P1.

O estímulo consiste num conjunto de hexágonos apresentados num monitor a uma distância de 33 cm. As áreas dos hexágonos aumentam com a excentricidade, de modo a compensar a diferente densidade de cones ao longo da retina. Cada hexágono é modulado temporalmente entre branco e preto de acordo com a sequência-m binária (figura 6)<sup>(99, 100)</sup>.



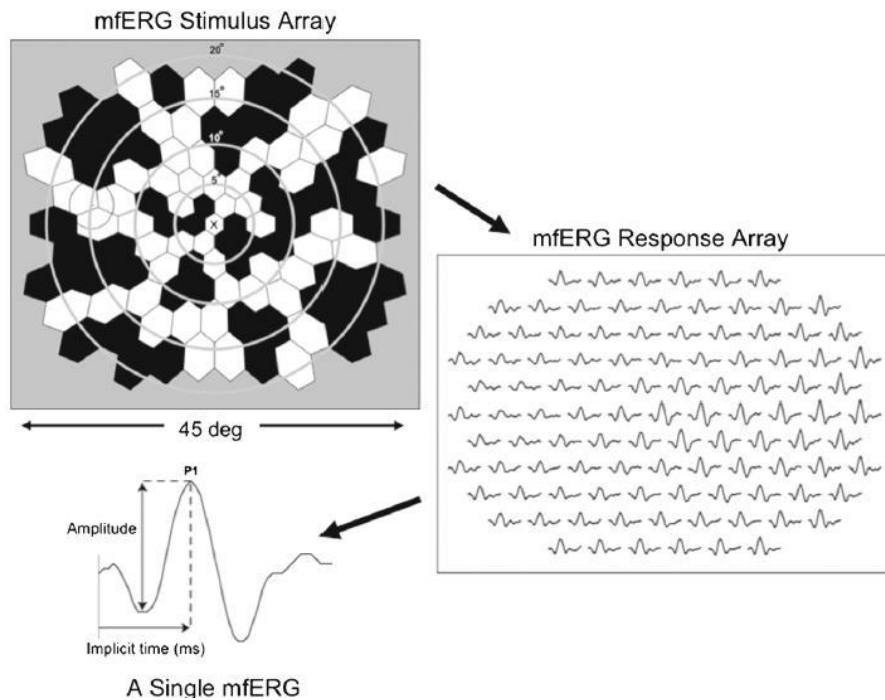


Figura 6 – Representação do estímulo apresentado e resultado da resposta retiniana no ERGmf.

O ERGmf permite o mapeamento da função da retina através da identificação e localização da extensão espacial da disfunção retiniana <sup>(99)</sup>. Tem possibilitado a associação da disfunção neurorretiniana localizada com o posterior desenvolvimento e progressão de lesões microvasculares de RD <sup>(60, 94, 101-103)</sup>.

Alterações locais da amplitude e atrasos do tempo de latência foram encontrados em doentes diabéticos com e sem lesões de RD <sup>(59, 93, 95, 104-107)</sup>. No ERGmf, o tempo entre o estímulo e o pico da onda de P1 (tempo de latência de P1) foi associado com a RD, correlacionado com a gravidade da retinopatia <sup>(60)</sup> e considerado um preditor do desenvolvimento de RD após um período de um ano <sup>(94, 103)</sup>.

Na DM observa-se mais do que um nível de lesão na retina. Os componentes da onda P1 no ERGmf são principalmente gerados pelas células bipolares <sup>(108)</sup>. Assim, de acordo com o “mecanismo de lesão na retina e alterações no ERGmf” proposto por Hood (2000), a lesão nas células bipolares terá um efeito pronunciado no ERGmf, que dependerá do mecanismo que gera a lesão, ou seja, uma perda local de células bipolares provocará uma diminuição na amplitude e um ligeiro a moderado atraso do tempo de latência; uma perda seletiva de células bipolares-On provocará uma diminuição da amplitude e um atraso moderado do tempo de latência; uma perda seletiva de células

bipolares-Off provocará um aumento da amplitude e o tempo de latência pode não ser alterado ou mesmo a resposta ser mais rápida <sup>(108)</sup>. Os neurónios envolvidos no sinal que investigamos (células bipolares) estão na mesma localização intrarretiniana que as células vasculares (camada nuclear interna), implicadas nas lesões de RD que se observam clinicamente. Assim, estes parâmetros da onda P1 do ERGmf podem ser candidatos a biomarcadores de alterações funcionais decorrentes da neurodegeneração que ocorre na retina de doentes diabéticos <sup>(6)</sup>.

### 1.3.3. Tomografia de Coerência Ótica

A tomografia de coerência ótica é um método não invasivo descrito pela primeira vez em 1991 <sup>(109)</sup>. Baseia-se no princípio da interferometria de baixa coerência, onde um feixe de luz é direcionado para um espelho que divide esse feixe em dois: um feixe de referência e um feixe de medida que atinge o olho. A luz refletida da amostra, constituída por múltiplos “ecos” e a luz refletida pelo espelho de referência, constituída por um único “eco” com atraso conhecido, são combinadas e geram a imagem bidimensional em corte transversal com uma resolução espacial muito elevada, em tempo-real e *in vivo* (figura 7) <sup>(109, 110)</sup>.

Nas últimas décadas, o OCT tem sido crescentemente utilizado, tanto na prática clínica como na investigação básica e clínica, pois permite avaliar de forma objetiva e não invasiva diferentes estruturas do olho, como a córnea, interface vítreo-retiniana, retina, nervo ótico e coróide, proporcionando uma imagem semelhante a um corte histológico, das camadas destas estruturas. Recentemente, através de *software* de segmentação, tem sido possível analisar de forma quantitativa e qualitativa a espessura e morfologia de todas as camadas da retina <sup>(111)</sup>.

Esta tecnologia tem permitido progressos significativos no conhecimento e caracterização de diversas situações fisiológicas e patológicas, permitindo de forma reprodutível e não invasiva a análise da evolução da doença e a avaliação da eficácia do tratamento ao longo do tempo.

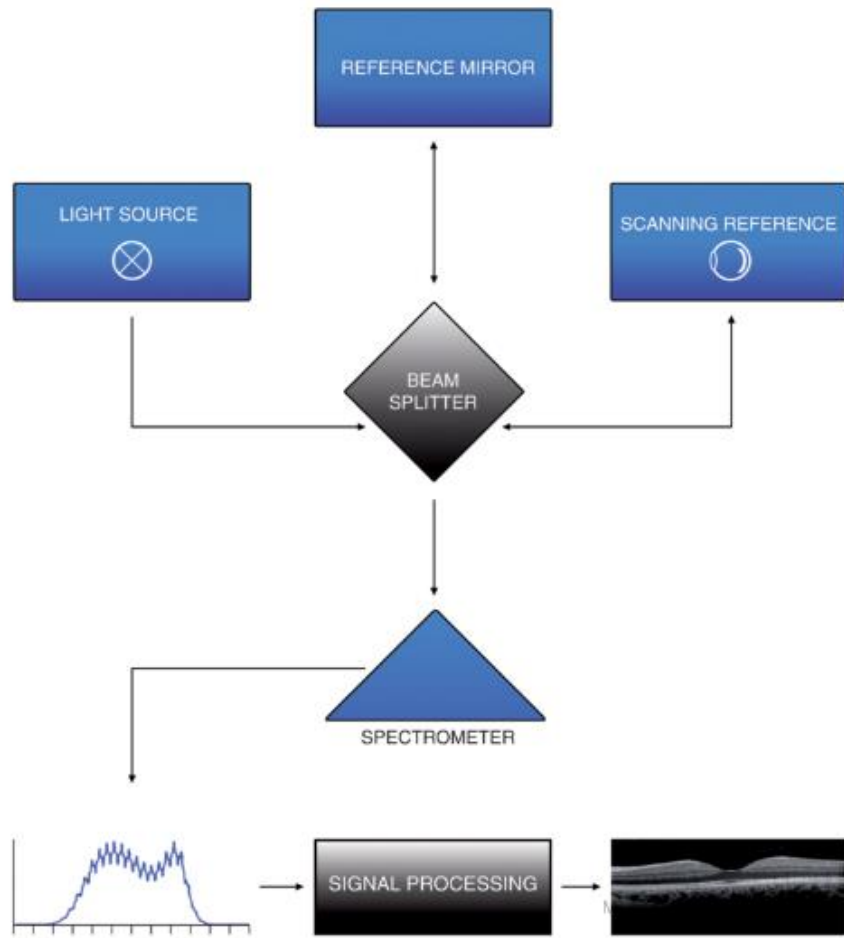


Figura 7 – Esquema representativo do princípio básico do SD-OCT.



## **2. Objetivo do presente trabalho**

O objetivo deste trabalho foi identificar alterações neurodegenerativas na retina de doentes diabéticos, sem lesões de RD (nível ETDRS 10) ou com lesões de RDNP (níveis ETDRS 20-35), por comparação com indivíduos saudáveis não diabéticos, através do SD-OCT e ERGmf, e posteriormente seguir estas alterações durante dois anos, para identificar como as referidas alterações se comportam ao longo do tempo.

Foi definido como objetivo secundário, neste estudo, estabelecer uma correlação entre as alterações das camadas da retina dos doentes diabéticos com o comportamento da onda P1 no ERGmf e com fatores sistémicos, duração da DM e hemoglobina glicada (HbA1c) aos 24 meses.



## 3. Métodos

### 3.1. Local de Execução e Desenho do Estudo

Este trabalho foi realizado no âmbito de um projeto multicêntrico europeu designado EUROCONDOR<sup>1</sup>. Trata-se de um estudo longitudinal, prospetivo e observacional com duração de dois anos, que decorreu em onze centros europeus de investigação clínica em oftalmologia, na Dinamarca, França, Alemanha, Itália, Portugal, Espanha e Reino Unido.

O estudo foi realizado de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia e aprovado pela comissão de ética e entidades reguladoras de cada centro participante. O objetivo e desenho do estudo foram explicados a todos os participantes e o consentimento informado foi assinado livremente e datado antes da realização da observação clínica e exames complementares.

Os resultados que se apresentam consistem na análise dos dados de doentes incluídos no grupo placebo no âmbito do projeto europeu EUROCONDOR (EudraCT Nº 2012-001200-38) no centro de Coimbra - Associação para a Investigação Biomédica e Inovação em Luz e Imagem (AIBILI).

---

<sup>1</sup> EUROCONDOR - Consórcio Europeu para o tratamento precoce da retinopatia diabética, com o objetivo de implementar o primeiro ensaio clínico utilizando colírios para o tratamento dos primeiros estádios da RD.

O EUROCONDOR (EudraCT Nº 2012-001200-38) é um projeto financiado pela Comissão Europeia (FP / - HEALTH 2011-278040) e destinado a implementar o primeiro ensaio clínico utilizando agentes neuroprotetores administrado topicamente (colírio) em doentes sem DR ou com DR apenas nos estádios iniciais (ETDRS≤35) ([http // eurocondor.eu](http://eurocondor.eu)). É constituído por um grupo de oftalmologistas europeus, endocrinologistas, pesquisadores básicos e com a participação de uma empresa de Biotecnologia (peptídeos BCN) e da Federação Internacional de Diabetes.

No ensaio clínico participaram 11 centros europeus de investigação clínica em Oftalmologia da Dinamarca, França, Alemanha, Itália, Portugal, Espanha e Reino Unido.

### 3.2. Amostra

Foram incluídos neste estudo 73 indivíduos com diagnóstico de DM tipo2, sem lesões de RD (ETDRS nível 10) ou com lesões de RDNP ligeira (ETDRS nível 20-35) na avaliação clínica.

Foram obtidas retinografias dos 7 campos aos dois olhos de cada participante e classificadas por um centro de leitura de imagens (Coimbra Ophthalmology Reading Centre - CORC), de acordo com a escala ETDRS, para determinação do nível de gravidade da RD. Um olho de cada doente diabético foi aleatoriamente incluído no estudo, de forma a reduzir os potenciais viés das condições sistémicas que podem afetar simultaneamente ambos os olhos.

Adicionalmente, foram incluídos 56 indivíduos saudáveis como grupo de controlo para este estudo. Os voluntários tinham idade compreendida entre 45-70 anos e exame oftalmológico normal, com melhor acuidade visual corrigida (MAVC)  $\geq$  20/20, biomicroscopia, pressão intraocular (PIO) e avaliação fundoscópica sem alterações. Neste grupo foi confirmada a ausência de DM ou de pré-diabetes através dos valores analíticos, tendo em conta os critérios de diagnóstico de DM, de acordo com a norma DGS Nº 2/2001.

### 3.3. Critérios de Inclusão e Exclusão

Neste estudo foram aplicados os seguintes critérios de inclusão:

- Indivíduos incluídos no grupo Placebo do estudo EUROCONDOR
- Diagnóstico de DM tipo 2;
- Idade compreendida entre 45-70 anos;
- MAVC  $\geq$ 20/25;
- Classificação de RD: nível 10 ou nível 20-35.

Os seguintes critérios de exclusão foram aplicados:

- Erro refrativo igual ou superior a 6 dioptrias;



- Outra patologia oftalmológica, como hipertensão ocular ou glaucoma, degenerescência macular relacionada com a idade, patologias vasculares retinianas, uveíte, buraco macular e neuropatias;
- Catarata que comprometa a visualização e aquisição de imagens do fundo ocular;
- MAVC < 20/25;
- Tratamento prévio com laser e/ou agentes anti-angiogénicos.

### **3.4. Cronograma**

Estudo longitudinal, observacional e prospetivo que pretende avaliar a neurodegeneração retiniana através da avaliação funcional e estrutural das camadas da retina, em doentes diabéticos tipo 2, sem RD (ETDRS nível 10) ou com RDNP ligeira (ETDRS nível 20-35), através do ERGmf e do SD-OCT, respetivamente., durante um período de 24 meses.

Na tabela 1 encontra-se o planeamento das três visitas do estudo e os procedimentos realizados no âmbito de cada visita:

- V0 – visita de pré-seleção, que incluiu a realização da história clínica dos participantes de forma a determinar a presença de DM, a duração da doença e registo de medicação concomitante;
- V1 – visita de inclusão, com realização dos exames analíticos (HbA1C) e medição da pressão arterial (PA), observação oftalmológica e exames imagiológicos (Retinografia para classificação do nível de RD, ERGmf e SD-OCT);
- V2 – 24 meses após V1, que incluiu avaliação analítica, oftalmológica e imagiológica.

Tabela 1 – Planeamento dos procedimentos realizados por visita

Procedimentos/ Visitas	Historia clínica	BIO	PIO	FO	MAVC	PA	HbA1C	ERGmf	SD- OCT	RET
Visita de pré-seleção (V0)	X	X	X	X	X	X	X			
Visita de inclusão (V1)		X	X	X	X	X		X	X	X
Visita aos 24 meses de follow-up (V2)		X	X	X	X	X	X	X	X	X

BIO – Biomicroscopia; PIO – Pressão Intra-Ocular; FO – Fundoscopia; MAVC – melhor acuidade visual corrigida; RET – retinografia; SD-OCT – tomografia de coerência óptica de domínio espectral; ERGmf – electroretinografia multifocal; PA – Pressão Arterial; HbA1C – Hemoglobina Glicada.

### 3.5. Procedimentos

De forma a garantir a qualidade e reprodutibilidade dos exames efetuados, foram estabelecidos protocolos de aquisição e classificação da retinografia, dos *scans* de SD-OCT e do ERGmf, bem como, certificação dos técnicos que realizaram os exames e dos equipamentos utilizados.

Todos os técnicos que participaram no estudo foram certificados pelo CORC para a aquisição de retinografia, SD-OCT e ERGmf. Para obter a certificação realizaram dois casos clínicos, para cada exame, e obtiveram resposta positiva por parte do centro de leitura.

Todos os centros utilizaram a mesma marca de equipamento de SD-OCT (*Cirrus<sup>TM</sup> HD-OCT 5000, Carl Zeiss*) e de ERGmf (*RETI-port/scan21, Roland Consult®*), com parâmetros de aquisição fixos; e retinografo que permitisse adquirir imagens a 35° e a 50°. Os equipamentos utilizados foram certificados.

### **3.5.1. História Clínica**

O médico oftalmologista realizou o exame oftalmológico, incluindo a biomicroscopia, medição de PIO e fundoscopia, e recolheu a história clínica, registrando a idade, sexo, duração da DM e medicação concomitante

A colheita de sangue foi realizada por um enfermeiro e enviada para laboratório para análise e determinação de HbA1c. Foi registada a medição da PA, peso e altura, com cálculo do índice de massa corporal (IMC).

### **3.5.2. Acuidade Visual**

A melhor acuidade visual corrigida (MAVC) foi avaliada para longe, em ambos os olhos, usando a escala ETDRS, e registada sob a forma de *score* (número de letras), por um técnico certificado para este procedimento.

### **3.5.3. Eletrorretinograma multifocal**

O ERGmf ao olho de estudo foi realizado após midríase pupilar com tropicamida a 1% e fenilefrina a 2.5%.

O protocolo de aquisição de ERGmf foi estabelecido com base nas diretrizes da Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV) <sup>(99)</sup>. Todo o equipamento foi configurado com parâmetros fixos de aquisição.

Antes de colocar os elétrodos, a pele foi limpa com um gel abrasivo, o elétrodo referência foi colocado perto do rebordo orbital e o elétrodo terra foi colocado na testa. Administrou-se uma gota de anestésico tópico antes de se colocar o elétrodo DTL-plus na conjuntiva tarsal inferior e a impedância foi verificada. O olho contra lateral foi ocluído.

Uma lente de + 3D foi adicionada à refração do paciente no suporte de lente em frente ao olho, e o doente foi instruído para fixar uma cruz vermelha no centro do monitor.

O estímulo consistiu em 103 elementos hexagonais, de tamanho escalonado tendo em conta a excentricidade retiniana, para obter respostas de amplitudes similares

em 6 anéis concêntricos. A luminância dos estímulos hexagonais pretos (<2 cd/m<sup>2</sup>) e brancos (120 cd/m<sup>2</sup>) foi modulada com frequência de 60Hz de acordo com uma sequência-m binária, usando on/off com uma probabilidade de 50.0%. As respostas retinianas foram amplificadas com ganho de 100.000 usando um filtro passa banda de 10-100Hz. Obtiveram-se 12 ciclos com duração de 47 segundo cada com nível de rejeição de artefacto de 10.0%.

Relativamente à análise dos exames realizados, o protocolo de classificação teve em conta a qualidade do exame, que se baseou na avaliação da fixação, forma da onda, posição dos cursores e quantidade de ruído. Os exames com fixação excêntrica e/ou presença de muito ruído que afete a forma típica da onda foram excluídos da análise.

Quantitativamente, foram avaliados os valores da amplitude de P1 (nV / deg<sup>2</sup>) e do tempo de latência de P1 (ms), calculados para cada hexágono e analisados em seis anéis concêntricos (figura 8). As análises foram realizadas utilizando os resultados de K1.

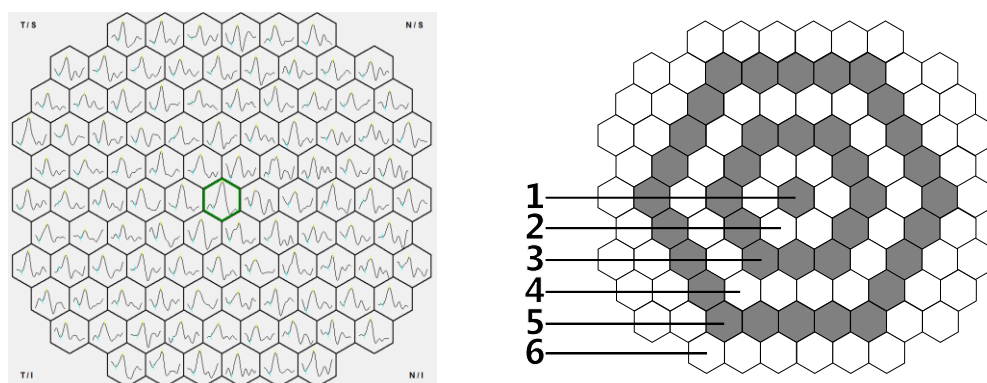


Figura 8 – Representação da morfologia da onda nos 103 hexágonos (imagem à esquerda) e representação dos 6 anéis concêntricos (imagem à direita).

### 3.5.4. Tomografia de Coerência Óptica

O SD-OCT foi obtido com o SD-OCT *Cirrus 5000* (Carl Zeiss, Meditec USA®), em condições mesópicas e após midríase farmacológica. Em todas as visitas o SD-OCT foi realizado a ambos os olhos, embora apenas o olho de estudo tenha sido considerado para análise.

Foi usado o protocolo de aquisição *Macular Cube 512x128*, centrado na fóvea (figura 9). Todos os *B-scans* foram revistos pelo técnico durante a execução do exame, para assegurar que estavam centrados na fóvea, e repetidos sempre que necessário

Somente as aquisições com imagens centradas e focadas, sem desalinhamentos, com um padrão contínuo sem falhas ou artefactos e com índice de qualidade maior que 7 foram incluídos na análise.

A análise da espessura das camadas da retina foi realizada nos 6mm centrais, usando a grelha ETDRS. Esta grelha é circular, composta por nove áreas, que incluem uma área central em disco (área macular central, 1mm central), rodeada por dois anéis concêntricos, interno e externo. O diâmetro do círculo central é 1000  $\mu\text{m}$  e dos anéis interno e externo é de 3000  $\mu\text{m}$  e 6000  $\mu\text{m}$ , respetivamente. Cada anel é ainda subdividido em quatro subcampos por quatro linhas radiárias em posição oblíqua (nasal interno (NI), inferior interno (II), temporal interno (TI) e superior interno (SI); e nasal externo (NE), inferior externo (IE), temporal externo (TE) e superior externo (SE) (figura 11).

As camadas da retina foram identificadas da seguinte forma (da superfície interna para a externa): camada de fibras nervosas da retina (CFN), complexo da camadas de células ganglionares e camada plexiforme interna (CCG/CPI), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme externa (CPE), complexo da camada nuclear externa e segmento interno dos fotorreceptores (CNE/SIF), segmento externo dos fotorreceptores (SEF), e Epitélio Pigmentado da Retina.

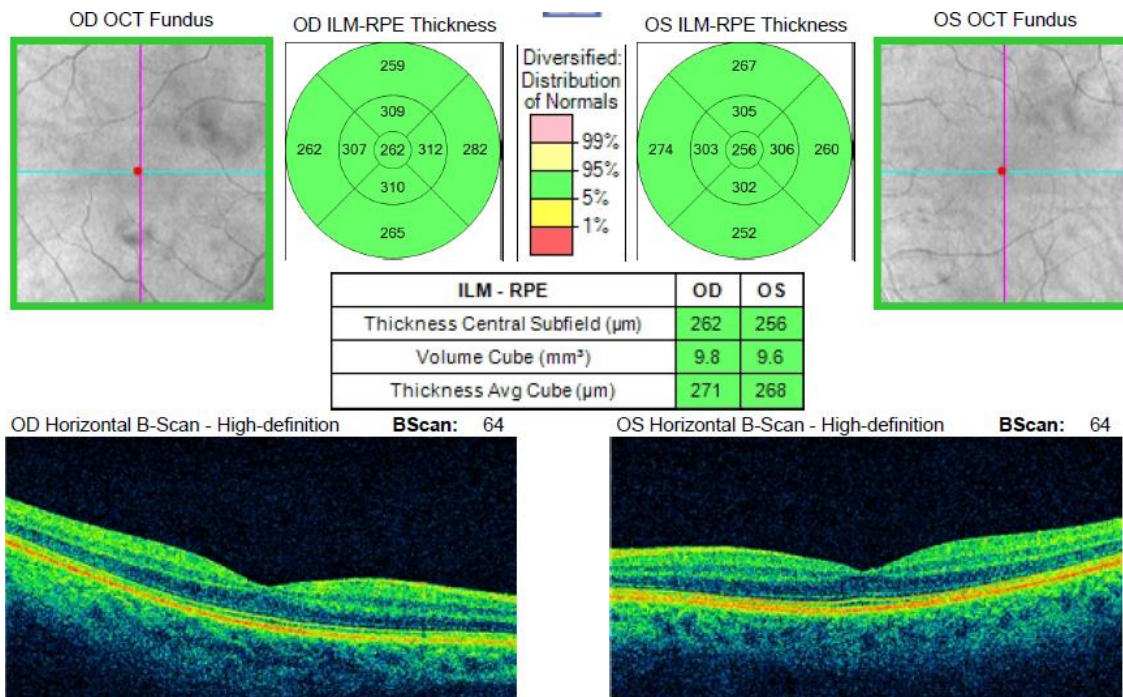


Figura 9 – Protocolo de aquisição (Macular Cube 512x128 scans) da espessura média da retina e representação da espessura média nas nove áreas da grelha ETDRS.

Para a identificação e análise das camadas da retina foi implementado em MATLAB (MathWorks ®) um algoritmo de segmentação semi-automático, baseado no método descrito por Li *et al.* <sup>(112)</sup>.

O passo automático foi parametrizado para identificar oito interfaces retinianas (da superfície interna para a externa): 1- vítreo-membrana limitante interna; 2- camada das fibras nervosas-camada das células ganglionares; 3- camada plexiforme interna-camada nuclear interna; 4- camada nuclear interna-camada plexiforme externa; 5- camada plexiforme externa-camada nuclear externa; 6- camada nuclear externa-segmento interno dos fotorreceptores; 7- segmento externo dos fotorreceptores-epitélio pigmentado da retina (EPR) e 8- EPR-coróide (figura 10). Após o passo automático, a localização das interfaces foi verificada por *graders* que efetuaram correções manuais quando necessário.

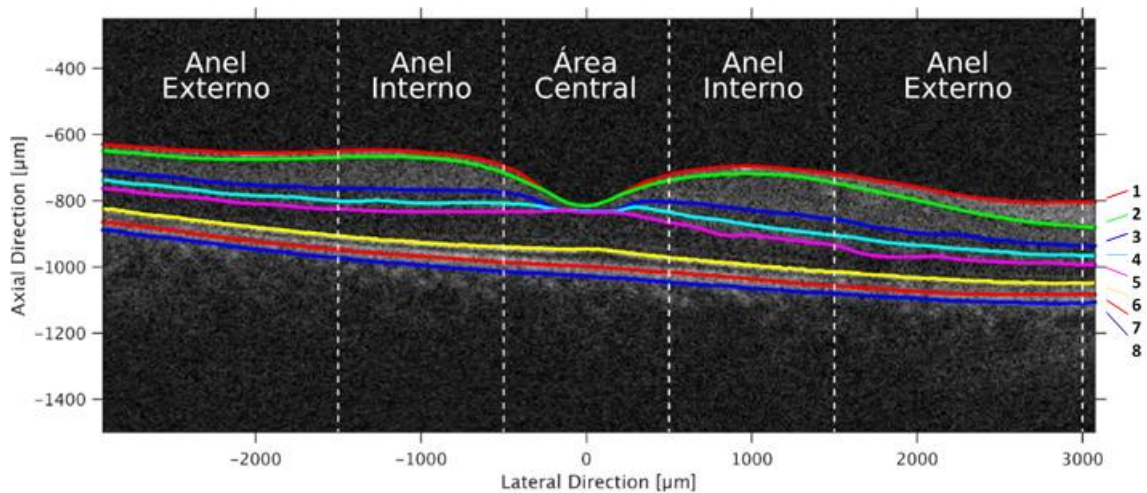


Figura 10 – Representação da segmentação das camadas da retina, imagem devolvida pelo programa MATLAB.

O algoritmo foi aplicado ao protocolo Macular Cube 512x128 obtendo-se a espessura média individualizada das camadas da retina nas nove áreas da grelha ETDRS.

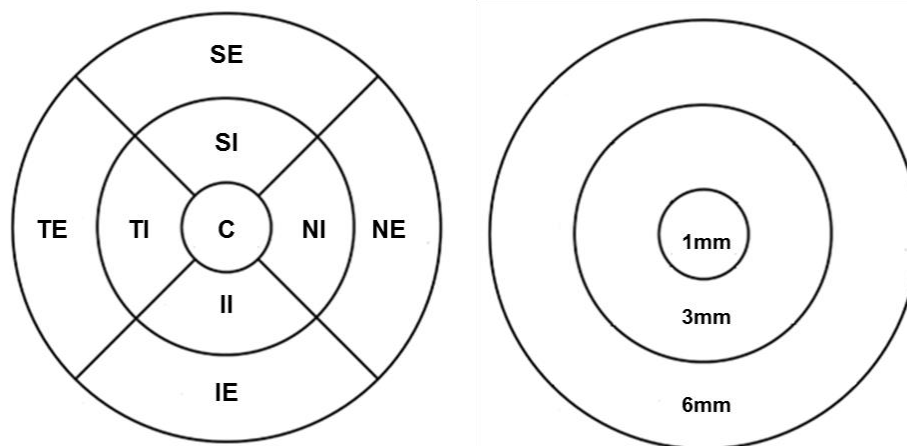


Figura 11 – Representação das nove áreas da grelha ETDRS (imagem à esquerda) e da área central e os 2 anéis concêntricos (imagem à direita). C – centro; SI – superior interno; NI – nasal interno; II – inferior interno e TI – temporal interno; SE- superior externo; NE – nasal externo; IE – inferior externo; TE – temporal externo; Imagem à direita representa a área central (1mm); anel interno (3mm) e anel externo (6mm)

### 3.5.5. Retinografia

As retinografias foram obtidas nos 7 campos *standard* ETDRS do polo posterior, a 35º, com exceção do campo 2, a 50º, com centragem e definição de campo de acordo com o protocolo ETDRS <sup>(46)</sup>, em ambos os olhos, na V1 e V2.

Foram classificadas por um centro de leitura, de acordo com a classificação ETDRS <sup>(46)</sup>, com quantificação dos sinais de RD escalados por gravidade em cada campo fotográfico, por comparação com fotografias *standard*. (Tabela 2).

Tabela 2 – Escala ETDRS de Gravidade da Retinopatia Diabética

Nível ETDRS	Gravidade	Definição
10	Sem RD	Ausência de microaneurismas e de outras características
20	Apenas microaneurismas	Microaneurismas definitivos; ausência de outras características
35	RDNP ligeira	35A - Venous loops $\geq$ D/1
		35B - SE, IRMAs or VB = Q
		35C - Presenças de Hemorragias retinianas
		35D - HE $\geq$ D/1
		35E - HE $\geq$ M/1
		35F - SE $\geq$ D/1

SE – Exsudados Algodonosos; IRMAs - *Intraretinal Microvascular Abnormalities*; VB – *Venous Beading*; HE – Exsudados Duros; D/1 – Definitivos pelo menos em um campo; M/1 – Moderados pelo menos em um campo; Q – Questionável.



## 4. Análise Estatística

Para análise e tratamento estatístico foi utilizado IBM® SPSS® *Statistics* versão 22 e *Microsoft® Office Excel* 2013.

As variáveis categóricas são apresentadas através de frequências absolutas (contagens) e relativas (percentagens) e as variáveis quantitativas são apresentadas através da sua média  $\pm$  desvio-padrão (DP) ou mediana e amplitude interquartil (AIQ: 1º Quartil – 3º Quartil), conforme adequado.

Aplicou-se o teste *t-Student* para amostras independentes para avaliar a diferença entre grupos relativamente às variáveis idade, duração da DM, valor de HbA1c e Índice de Massa Corporal (IMC), uma vez que estas eram normalmente distribuídas em cada um dos grupos.

Recorreu-se à *One-Way ANOVA* para testar a igualdade da média relativamente às variáveis tempo de latência da onda P1, amplitude da onda P1 e espessura das camadas da retina entre os dois grupos de doentes diabéticos e o grupo controlo. Foram realizados testes *post-hoc* para comparar as médias entre cada par de grupos, usando *Bonferroni* para corrigir comparações múltiplas.

Determinou-se o coeficiente de *Pearson* para avaliar a eventual existência de correlação entre as variáveis duração da diabetes, HbA1c, espessura das camadas da retina, tempo de latência e amplitude de P1. Correlacionou-se o anel 1 do ERGmf com a área central do SD-OCT (área foveal), o anel 2 do ERGmf com o anel interno do SD-OCT (área parafoveal) e o anel 3 do ERGmf com o anel externo do SD-OCT (área perifoveal).

Resultados com valores-p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.



## 5. Resultados

### 5.1. Caracterização demográfica da Amostra

Dos 129 doentes diabéticos avaliados na visita de pré-seleção do estudo EUROCONDOR, 73 cumpriam os critérios de elegibilidade para participar e foram incluídos neste estudo. Neste grupo de 73 doentes diabéticos, 30 foram classificados no nível de gravidade de RD ETDRS 10 e 43 no nível ETDRS 20-35.

Um grupo de 56 indivíduos sem DM, dos quais 75.0% do género masculino, e com uma idade média de  $53.71 \pm 6.5$  anos, foram avaliados na consulta de oftalmologia geral de cada centro de ensaios clínicos, e foram incluídos no grupo controlo. Este grupo permitiu estabelecer as bases normativas do ERGmf e da espessura das camadas da retina do SD-OCT.

As bases normativas estabelecidas foram usadas para comparação com os exames realizados pelos doentes diabéticos incluídos no estudo, e para detetar alterações (aumento ou diminuição) dos parâmetros em estudo. A análise da base normativa do ERGmf encontra-se mais detalhada em Simão *et al.* (anexo 1).

O presente trabalho incluiu 2 grupos de estudo:

- Grupo ETDRS nível 10: 30 doentes diabéticos sem lesões de RD (30 olhos) (76.7% género masculino) e
- Grupo ETDRS nível 20-35: 43 doentes diabéticos com lesões de RDNP ligeira (43 olhos) (67.4 % do género masculino)

Os dados demográficos e clínicos dos grupos de diabéticos podem ser consultados na tabela 3.

Nos doentes diabéticos do grupo ETDRS nível 20-35 verificou-se uma diferença estatisticamente significativa quanto à presença de hipertensão arterial ( $p=0.002$ ).

O grupo ETDRS nível 20-35 apresentou valores superiores de HbA1c e maior duração de DM que o grupo ETDRS nível 10, apesar destas diferenças não serem estatisticamente significativas ( $p=0.053$  e  $p=0.181$ , respetivamente).

Tabela 3 – Características demográficas e clínicas por grupo diabético na V1

	<b>Grupo ETDRS nível 10 (n=30)</b>	<b>Grupo ETDRS nível 20-35 (n=43)</b>	<b>valor p</b>
<b>Gênero n (%) (M:F)</b>	23 (76.7) : 7 (23.3)	29 (67.4) : 14 (32.6)	0.392 <sup>†</sup>
<b>Idade (anos)</b>	64.47 (6.9)	61.77 (7.3)	0.115 <sup>*</sup>
<b>Duração diabetes (anos)</b>	10.95 (5.9)	12.86 (6.0)	0.181 <sup>*</sup>
<b>HbA1C (%)</b>	6.94 (0.8)	7.38 (1.1)	0.053 <sup>*</sup>
<b>MAVC (nº letras)</b>	85.67 (5.7)	85.42 (4.5)	0.837 <sup>*</sup>
<b>IMC</b>	29.90 (4.7)	30.96 (6.6)	0.452 <sup>*</sup>
<b>Hipertensão n (%) (sim:não)</b>	15 (50) : 15 (50)	36 (83.7) : 7 (16.3)	<b>0.002</b> <sup>†</sup>
<b>Dislipidemia n (%) (sim:não)</b>	18 (60) : 12 (40)	31 (72.1) : 12 (27.9)	0.279 <sup>†</sup>
<b>Fumador n (%) (sim:não)</b>	3 (10) : 27 (90)	3 (7) : 40 (93)	0.644 <sup>†</sup>
<b>Triglicerídeos</b>	100.88 (75.3)	119.95 (68.9)	0.267 <sup>*</sup>
<b>Colesterol total</b>	173.75 (24.7)	177.68 (42.8)	0.622 <sup>*</sup>
<b>PAM (mmHg)</b>	96.13 (7.4)	96.19 (9.2)	0.976 <sup>*</sup>

Resultados expressos em média (DP). \* Teste *t-Student*; † Teste Qui-quadrado; MAVC - Melhor Acuidade Visual Corrigida, PIO - Pressão Intraocular, HbA1c - Hemoglobina Glicada, IMC – Índice de Massa Corporal. PAM- Pressão Arterial Média; M – masculino; F – feminino.

As características clínicas observadas na V2 (24 meses) estão apresentadas na tabela 4, com exceção dos resultados do ERGmf e SD-OCT.

Na V2, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas variáveis analisadas. No entanto, o grupo ETDRS nível 20-35 apresentou valores médios de HbA1c superiores ao grupo ETDRS nível 10.

Tabela 4 – Características Clínicas por grupo diabéticos na V2

	<b>Grupo ETDRS nível 10 (N=30)</b>	<b>Grupo ETDRS nível 20-35 (N=43)</b>	<b>valor p*</b>
<b>HbA1C (%)</b>	7.14 (1.2)	7.60 (1.7)	0.175
<b>MAVC (nº letras)</b>	86.00 (5.1)	85.56 (3.7)	0.669
<b>IMC</b>	29.28 (4.6)	32.13 (6.9)	0.050
<b>Triglicerídeos</b>	106.27 (77.9)	119.59 (63.2)	0.435
<b>Colesterol total</b>	174.16 (25.9)	178.47 (46.8)	0.620
<b>PAM (mmHg)</b>	96.47 (6.9)	95.60 (8.5)	0.655

Resultados expressos em média (DP). \* Teste t-Student; MAVC - Melhor Acuidade Visual Corrigida, PIO - Pressão Intraocular, HbA1c - Hemoglobina Glicada, IMC – Índice de Massa Corporal. PAM- Pressão Arterial Média

## 5.2. Resultados do Eletroretinograma multifocal

Foi estabelecida uma base normativa para o ERGmf, de forma a identificar possíveis alterações nos doentes diabéticos. A base normativa foi obtida no grupo controlo, constituída por 56 indivíduos saudáveis, sem DM e com faixa etária sobreponível (média de idade  $53.71 \pm 6.5$  anos). O grupo controlo realizou o ERGmf usando o mesmo protocolo de aquisição e de classificação do estudo.

Globalmente, a média do tempo de latência e da amplitude de P1 foi de  $35.49 \pm 1.8$  ms e  $53.96 \pm 8.7$  nV/deg<sup>2</sup>, respetivamente.

Foi considerada alteração no ERGmf uma diminuição da amplitude da onda P1 e/ou um aumento do tempo de latência (atraso do tempo de latência) da onda P1, calculado a partir dos valores da média  $\pm$  DP do grupo controlo.

## 5.2.1. Eletrorretinograma multifocal na Visita Inicial (v1)

### 5.2.1.1. Análise Global

#### Tempo de latência

A análise global dos resultados do ERGmf em v1, considerando todos os anéis, revelou um aumento significativo do tempo de latência da onda P1, em ambos os grupos de doentes diabéticos, comparativamente ao grupo controlo (mediana = 35.86 ms (AIQ: 34.3 – 36.8 ms)) vs 36.85 ms (AIQ: 35.6 – 37.6 ms),  $p=0.014$  no grupo ETDRS nível 10 vs 37.27 ms (AIQ: 35.9 – 38.1 ms),  $p<0.001$  no grupo ETDRS nível 20-35, conforme representado na figura 12.

O aumento do tempo de latência ocorreu em 26.7% dos doentes diabéticos do grupo ETDRS nível 10 (sem RD), e em 48.8% do grupo ETDRS nível 20-35 (com RDNP ligeira).

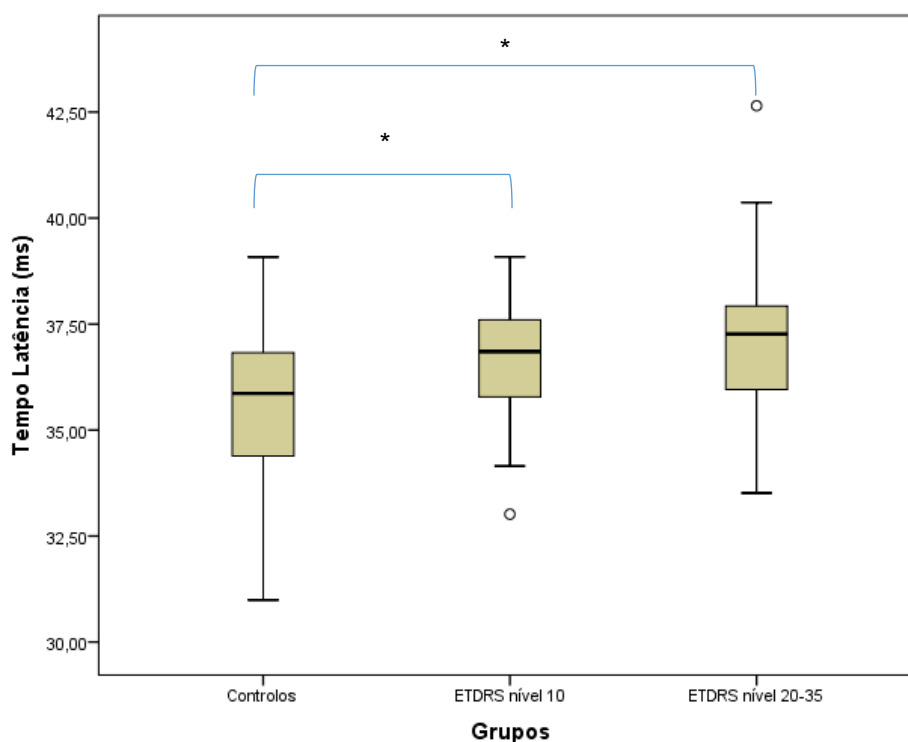


Figura 12 – Representação gráfica do tipo *Box Plot* do tempo de latência (ms) da onda P1 nos diferentes grupos analisados. Resultados expressos em mediana (AIQ: Q1 – Q3). \*  $p<0.05$  – *Bonferroni* para comparações múltiplas.

## Amplitude

Relativamente à amplitude, na análise global de todos os anéis na v1, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa nos doentes diabéticos, quando comparados com o grupo controlo (47.08 nV/deg<sup>2</sup> (AIQ: 40.6 – 57.9 nV/deg<sup>2</sup>), p=0.010 no grupo ETDRS nível 10, vs 43.32 nV/deg<sup>2</sup> (AIQ: 36.1 – 55.6 nV/deg<sup>2</sup>), p<0.001 no grupo ETDRS nível 20-35 vs 53.18 nV/deg<sup>2</sup> (AIQ: 48.5 – 58.5 nV/deg<sup>2</sup>)).

Também se observou uma diminuição da amplitude de P1 nos doentes do grupo ETDRS nível 20-35 em comparação com os do grupo ETDRS nível 10, embora não estatisticamente significativa (p=0.69), conforme representado na figura 13.

A amplitude encontrava-se diminuída em 46.7% dos doentes diabéticos sem RD e em 55.8% dos doentes diabéticos com RDNP ligeira.

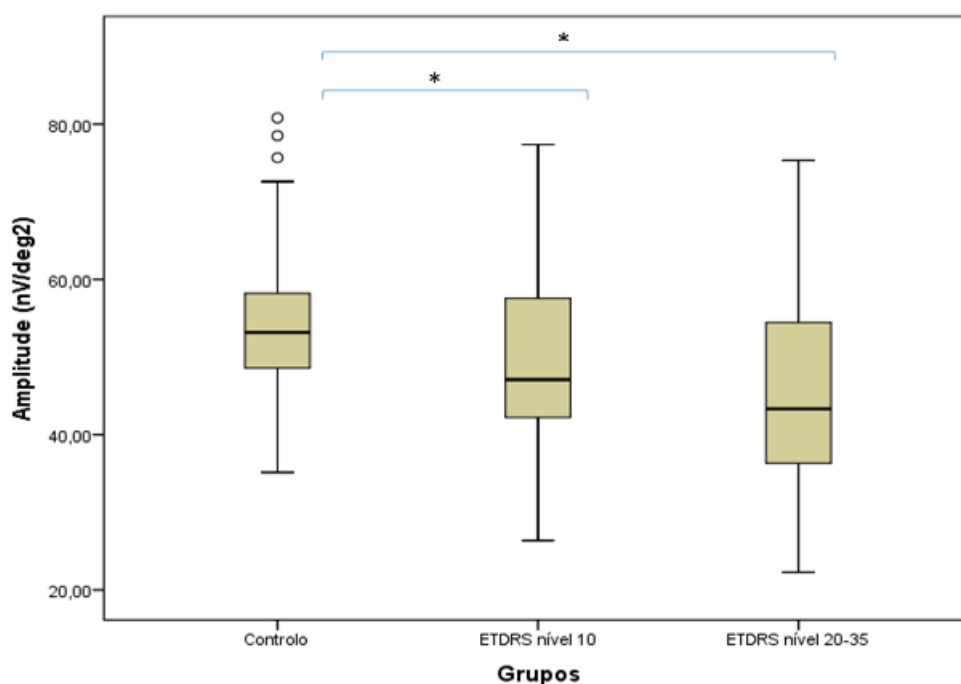


Figura 13 - Representação gráfica do tipo *Box Plot* da amplitude (nV/deg<sup>2</sup>) da onda P1 nos diferentes grupos analisados. Resultados expressos em mediana (AIQ: Q1 – Q3). \* p<0.05 – *Bonferroni* para comparações múltiplas.

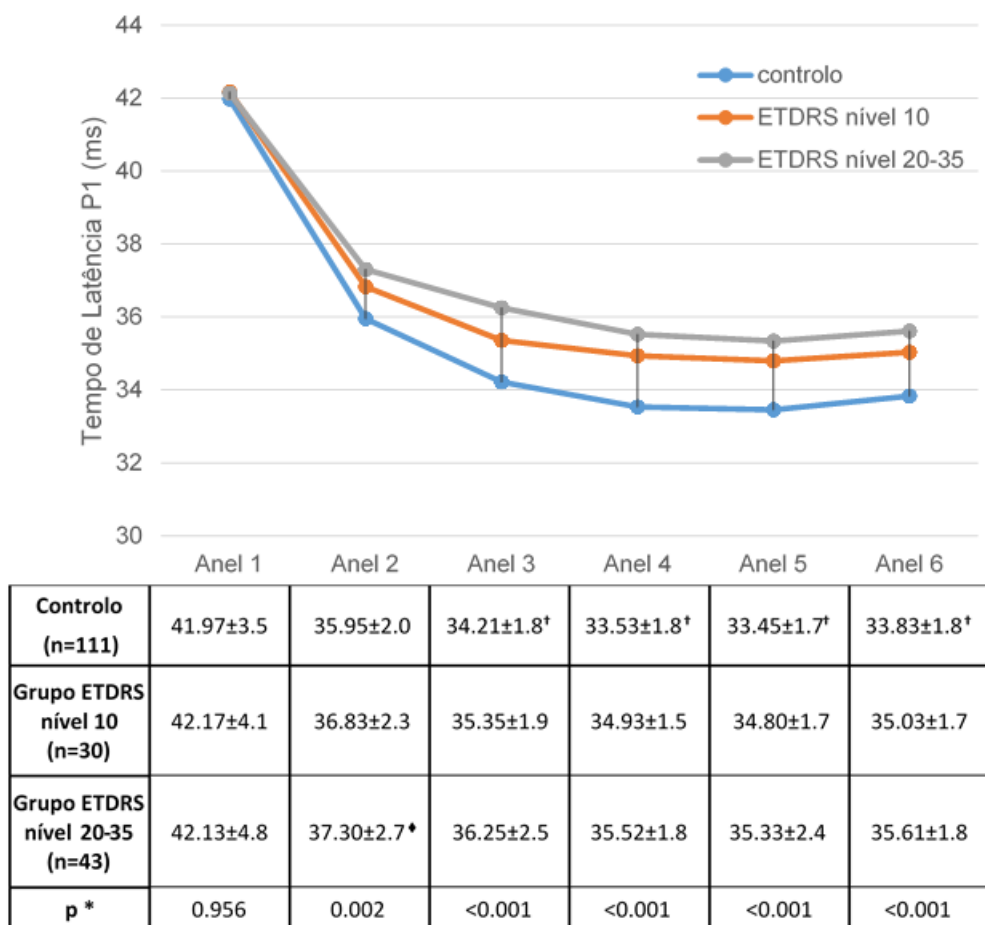
### 5.2.1.2. Análise por anéis

#### Tempo de latência

Como referido anteriormente, em geral, observou-se um aumento do tempo de latência e uma diminuição da amplitude da onda P1 nos diabéticos em relação ao grupo controlo. Estas alterações evidenciaram-se mais quando se realizou a análise destes parâmetros por anéis de excentricidade retiniana (figuras 14 e 15, respetivamente).

No que diz respeito ao tempo de latência da onda P1, a distribuição foi semelhante nos grupos de diabéticos e no grupo controlo, sendo o tempo de latência maior no anel central, diminuindo na parafovea e aumentando ligeiramente na periferia (anel 6).

Observou-se um aumento estatisticamente significativo do tempo de latência nos doentes diabéticos em relação ao grupo controlo nos cinco anéis periféricos ( $p=0.002$  ou  $p<0.001$ ).



\* valor p de ANOVA; <sup>†</sup>significativamente diferente de ETDRS <20 e ETDRS 20-35; <sup>♦</sup>significativamente diferente de controlo



Analisando estes resultados por grupo, no grupo ETDRS nível 10 observou-se um aumento do tempo de latência de P1 em todos os anéis, estatisticamente significativo nos quatro anéis periféricos (anel 3,  $p=0.018$ ; anel 4,  $p<0.001$ ; anel 5,  $p=0.002$  e anel 6,  $p=0.004$ ). Embora o aumento do tempo de latência observado nos anéis 1 e 2 não foi estatisticamente significativo, foi observado em 20.0% no anel 1 e em 36.7% no anel 2, dos doentes sem RD.

No grupo ETDRS nível 20-35 verificou-se um aumento do tempo de latência da onda P1, estatisticamente significativo em todos os anéis (anel 2,  $p=0.003$ ; anéis 3,4,5 e 6,  $p<0.001$ ), com a exceção do anel 1. No entanto, nesta localização, ocorreu um aumento do tempo de latência de P1 em 23.3.0% dos doentes.

Apesar das diferenças entre os grupos de doentes diabéticos e o grupo controlo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de doentes diabéticos, no que respeita ao tempo de latência de P1.

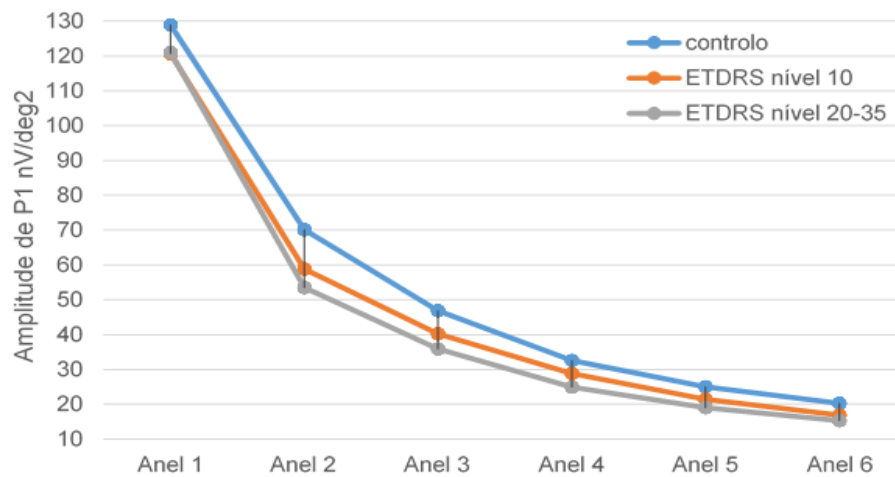
### **Amplitude**

Relativamente à amplitude da onda P1, observou-se uma diminuição progressiva da amplitude compatível com a excentricidade retiniana, quer nos doentes diabéticos, quer no grupo controlo (figura 15).

A diminuição da amplitude da onda P1 observada no anel 1 dos doentes diabéticos não foi estatisticamente significativa ( $p=0.221$ ). Contudo, foi constatada em 16.7% dos doentes diabéticos sem RD e em 20.9% dos diabéticos com RDNP ligeira.

Nos restantes anéis analisados (anel 2-6), ambos os grupos de doentes diabéticos apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa da amplitude da onda P1, em comparação com o grupo controlo (anel 2,  $p<0.001$ ; anel 3,  $p=0.002$ ; anel 4,  $p=0.021$ ; anel 5,  $p=0.004$  e anel 6,  $p=0.002$  no grupo ETDRS nível 10 e anéis 2 a 6,  $p<0.001$  no grupo ETDRS nível 20-35).

Quando comparada a amplitude entre os dois grupos de doentes diabéticos, foi o anel 4 que mostrou diferenças estatisticamente significativas ( $p=0.040$ ), sendo o grupo ETDRS nível 20-35 (RDNP ligeira) o grupo que apresentou uma menor amplitude, ou seja, maior alteração deste parâmetro funcional.



<b>Controlo (n=111)</b>	128.93±26.4	70.15±13.3 <sup>†</sup>	46.83±8.3 <sup>†</sup>	32.56±5.7 <sup>†</sup>	25.02±4.7 <sup>†</sup>	20.27±4.0 <sup>†</sup>
<b>Grupo ETDRS nível 10 (n=30)</b>	120.71±32.1	58.80±14.4	40.25±11.7	28.86±9.4 <sup>‡</sup>	21.45±7.2	16.85±5.8
<b>Grupo ETDRS nível 20-35 (n=43)</b>	121.08±30.1	53.51±12.9	35.89±8.8	24.97±6.5 <sup>§</sup>	19.00±5.0	15.33±5.4
<b>p *</b>	0.221	<0.001	<0.001	<b>&lt;0.001</b>	<0.001	<0.001

\* valor p de ANOVA; <sup>†</sup>significativamente diferente de ETDRS <20 e ETDRS 20-35; <sup>‡</sup>significativamente diferente de controlo e ETDRS 20-35; <sup>§</sup>significativamente diferente de controlo e ETDRS <20;

Figura 15 – Representação da amplitude (nV/deg<sup>2</sup>) da onda de P1 por anel de excentricidade retiniana.

### 5.3. Tomografia de Coerência Ótica na V1

A partir do algoritmo utilizado para a segmentação dos *scans* de SD-OCT da retina, foi obtida a espessura das diferentes camadas da retina nas nove áreas da grelha macular ETDRS.

Quando se compararam os valores de espessura das camadas da retina nos doentes diabéticos sem RD (grupo ETDRS nível 10) ou com RDNP ligeira (grupo ETDRS nível 20-35) e o grupo controlo, observaram-se alterações (aumento ou diminuição) em camadas específicas da retina (tabelas 5, 6 e 7).

#### 5.3.1. Espessura retiniana das camadas da retina no anel central

Na área macular central verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na espessura da camada nuclear interna ( $F(2,116) = 12.344, p < 0.001$ ), da camada plexiforme externa ( $F(2,116) = 6.623, p = 0.002$ ), da camada dos segmentos externos dos fotorreceptores ( $F(2,116) = 14.864, p < 0.001$ ) e do epitélio pigmentado da retina ( $F(2,116) = 7.544, p = 0.001$ ) entre o grupo controlo e os grupos de doentes diabéticos (tabela 5)

Comparativamente ao grupo controlo, após a análise do teste *post-hoc*, 50.0% dos doentes do grupo ETDRS nível 10 apresentaram uma maior espessura da camada nuclear interna ( $p = 0.001$ ), 43.3% apresentaram uma espessura maior da camada plexiforme externa ( $p = 0.113$ ) e 50.0% dos doentes apresentaram maior espessura do epitélio pigmentado ( $p = 0.001$ ). Por outro lado, observou-se uma menor espessura da camada de fibras nervosas em 43.0% dos doentes ( $p = 0.981$ ) e uma menor espessura dos segmentos externos dos fotorreceptores em 60.0% dos doentes ( $p < 0.001$ ).

Em relação ao grupo ETDRS nível 20-35, quando comparado com o grupo controlo, 53.5% dos doentes apresentaram uma maior espessura da camada nuclear interna ( $p < 0.001$ ), 41.9% dos doentes apresentaram uma maior espessura da camada plexiforme externa ( $p = 0.001$ ) e 48.8% dos doentes apresentaram uma maior espessura do epitélio pigmentado da retina ( $p = 0.021$ ). Observou-se ainda, em 25.6% de doentes, um aumento não significativo da espessura da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna ( $p = 0.961$ ). Por outro lado, observou-se uma diminuição da espessura

da camada dos segmentos externos dos fotorreceptores (67.4% dos doentes) ( $p < 0.001$ ) e da camada de fibras nervosas (46.5% dos doentes) ( $p = 0.175$ ).

Comparando-se a espessura das camadas retinianas entre os dois grupos de doentes diabéticos, não se observaram diferenças estatisticamente significativas em qualquer das camadas analisadas.

Tabela 5 – Espessura das camadas da retina ( $\mu\text{m}$ ) no anel central na V1, diferença média comparativamente ao grupo controlo

Camada	ETDRS nível 10 n=30	Diferença Média ( $\mu\text{m}$ )	IC de 95% (LI;LS)	ETDRS nível 20-35 n=43	Diferença Média ( $\mu\text{m}$ )	IC de 95% (LI;LS)	Controlos n=56	Valor p *
CFN	6.18 $\pm$ 4.9	0.46	-1.9; 2.8	4.97 $\pm$ 4.4	1.68	-0.5; 3.8	6.64 $\pm$ 3.3	0.153
CCG/CPI	43.07 $\pm$ 9.5	0.40	-4.5; 5.3	45.18 $\pm$ 8.8	-1.71	-6.2; 2.7	43.48 $\pm$ 7.9	0.517
CNI	22.03 $\pm$ 5.5	-4.91	-8.0; -1.8	22.28 $\pm$ 5.9	-5.16	-7.9; -2.4	17.12 $\pm$ 4.8 <sup>†</sup>	<b>&lt;0.001</b>
CPE	25.46 $\pm$ 5.3	-3.61	-7.9; 0.7	27.64 $\pm$ 10.6 <sup>‡</sup>	-5.79	-9.7; -1.9	21.85 $\pm$ 5.0	<b>0.002</b>
CNE/SIF	113.90 $\pm$ 10.0	-0.57	-6.6; 5.5	112.8 $\pm$ 13.0	0.52	-5.0; 6.0	113.33 $\pm$ 8.2	0.911
SEF	38.76 $\pm$ 8.3	6.76	3.2; 10.3	39.45 $\pm$ 7.2	6.08	2.9; 9.3	45.23 $\pm$ 2.3 <sup>†</sup>	<b>&lt;0.001</b>
EPR	28.98 $\pm$ 5.1	-4.03	-6.7; -1.4	27.69 $\pm$ 5.8	-2.73	-5.1; -0.3	24.95 $\pm$ 2.8 <sup>†</sup>	<b>0.001</b>
RT	278.40 $\pm$ 21.0	-5.50	-18.1; 7.1	280.02 $\pm$ 26.2	-7.12	-18.5; 4.3	272.90 $\pm$ 18.4	0.290

\* p de ANOVA; <sup>†</sup>significativamente diferente de ETDRS <20 e ETDRS 20-35; <sup>‡</sup>significativamente diferente de controlos. IC – Intervalo de Confiança (LI – limite inferior; LS – limite superior). CFN – camada fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI – camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentado da retina; RT – retina total.

Considerando a espessura total da retina, na área macular central, e após comparação com o grupo controlo, constatou-se que 53.3% dos diabéticos do grupo ETDRS nível 10 (sem RD) e 58.1% dos diabéticos do grupo ETDRS nível 20-35 (RDNP ligeira) tinham espessura da retina normal (entre 254.5  $\mu\text{m}$  e 291.3  $\mu\text{m}$ ); 30.0% dos

doentes do grupo ETDRS nível 10 e 27.9% do grupo ETDRS nível 20-35 apresentavam aumento da espessura da retina (>291.3µm).

Numa tentativa de perceber que camadas retinianas poderiam contribuir para um aumento de espessura global da retina, foram analisadas as camadas isoladas em dois grupos (grupo com espessura considerada normal e grupo com espessura aumentada).

Nos doentes com espessura normal, observou-se um aumento da espessura da camada nuclear interna, em 50.0% dos doentes sem RD e 48.0% com RDNP ligeira, e da plexiforme externa (em 56.3% dos doentes sem RD e em 44.0% dos doentes com RDNP ligeira). Por outro lado, observou-se uma diminuição da espessura da camada dos segmentos externos dos fotorreceptores, em 62.5% dos diabéticos sem RD e em 64.0% nos diabéticos com RDNP ligeira, e da espessura da camada de fibras nervosas, em 44.0% e 52.0%, sem RD e com RDNP ligeira, respetivamente.

Nos doentes com aumento da espessura total da retina verificou-se um aumento significativo da espessura da camada nuclear interna (em 78.0% e 92.0%, nos grupos ETDRS nível 10 e nível 20-35, respetivamente). No grupo ETDRS nível 20-35, verificou-se, ainda, um aumento significativo da espessura da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna (75.0% dos doentes) e da camada plexiforme externa (50.0% dos doentes). Adicionalmente, nos dois grupos de diabéticos, observou-se uma diminuição da espessura da camada dos segmentos externos dos fotorreceptores, (56.0% e 75.0% dos doentes ETDRS nível 10 e nível 20-35, respetivamente). Esta diminuição já tinha sido observada nos doentes diabéticos com espessura retiniana dentro de limites normais.

### **5.3.2. Espessura das camadas da retina no anel interno na V1**

No anel interno ou parafoveal, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa da espessura da camada das células ganglionares da retina/camada plexiforme interna entre os doentes diabéticos e os controlos,  $F(2,116)=11.822$ ,  $p<0.001$  (tabela 6)

Considerando os doentes diabéticos por nível de gravidade de RD e o grupo de controlo, o teste *post-hoc* indicou uma espessura menor, estatisticamente significativa, da

camada de células ganglionares/camada plexiforme interna no grupo ETDRS nível 10 ( $p < 0.001$ ) e no grupo ETDRS nível 20-35 ( $p < 0.001$ ). No entanto, a espessura desta camada não foi significativamente diferente entre dois níveis de gravidade de RD ( $p = 0.998$ ).

A maior espessura da camada plexiforme externa nos doentes diabéticos face ao grupo controlo,  $F(2,116) = 3.218$ ,  $p = 0.044$ , perdeu significância estatística após se ter recorrido ao teste *post-hoc*, observando-se: grupo controlo vs grupo ETDRS nível 10 ( $p = 0.114$ ), grupo controlo vs grupo ETDRS nível 20-35 ( $p = 0.090$ ) e grupo ETDRS nível 10 vs ETDRS nível 20-35 ( $p = 0.998$ ).

Tabela 6 – Valores da espessura ( $\mu\text{m}$ ) média das camadas individuais da retina no anel interior na v1, diferença média comparativamente ao grupo controlo.

Camada	Grupo ETDRS nível 10 n=30	Diferença Média ( $\mu\text{m}$ )	IC de 95% (LI;LS)	Grupo ETDRS nível 20-35 n=43	Diferença Média ( $\mu\text{m}$ )	IC de 95% (LI;LS)	Grupo Controlo n=56	Valor p*
CFN	25.48 $\pm$ 2.7	-0.41	-1.8; 1.0	25.49 $\pm$ 2.8	-0.32	-1.6; 0.9	25.08 $\pm$ 2.4	0.740
CCG/CPI	87.98 $\pm$ 8.5	7.16	2.9; 11.4	88.57 $\pm$ 8.8	6.57	2.7; 10.4	95.14 $\pm$ 4.9	<b>&lt;0.001</b> <sup>†</sup>
CNI	41.43 $\pm$ 3.7	-1.66	-3.7; 0.4	39.99 $\pm$ 4.0	-0.22	-2.1; 1.7	39.77 $\pm$ 3.3	0.132
CPE	31.53 $\pm$ 4.0	-1.78	-3.8; 0.3	31.43 $\pm$ 4.2	-1.69	-3.6; 0.2	29.75 $\pm$ 2.7	<b>0.044</b> <sup>†</sup>
CNE/SIF	89.87 $\pm$ 8.0	0.05	-4.8; 4.9	90.55 $\pm$ 9.7	-0.63	-5.0; 3.7	89.91 $\pm$ 7.4	0.921
SEF	36.40 $\pm$ 4.9	0.84	-1.5; 3.2	35.88 $\pm$ 4.6	1.36	-0.8; 3.5	37.24 $\pm$ 2.9	0.293
EPR	26.69 $\pm$ 3.6	-0.78	-2.9; 1.3	23.16 $\pm$ 4.6	-0.25	-2.2; 1.7	25.91 $\pm$ 2.7	0.672

\* p de ANOVA; †significativamente diferente de ETDRS <20 e de ETDRS 20-35. IC – Intervalo de Confiança (LI – limite inferior; LS – limite superior). CFN – camada fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI – camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentado da retina.

### 5.3.3. Espessura das camadas da retina no anel externo na V1

No anel externo ou perifoveal, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na espessura da camada de fibras nervosas, camada células ganglionares/camada plexiforme interna e epitélio pigmentado da retina entre doentes diabéticos e grupo controlo ( $F(2,116)=3.082$ ,  $p=0.050$ ;  $F(2,116)=6.031$ ,  $p=0.003$  e  $F(2, 216)=7.598$ ,  $p=0.001$ , respetivamente).

O grupo ETDRS nível 10 apresentou uma diminuição da espessura, estatisticamente significativa, da camada de fibras nervosas ( $p=0.044$ ), camada de células ganglionares/camada plexiforme interna ( $p=0.040$ ) e epitélio pigmentado da retina ( $p=0.026$ ) comparativamente ao grupo controlo (tabela 7).

Tabela 7 – Valores médios de espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas individuais da retina no anel externo na v1, diferença média comparativamente ao grupo controlo.

Camada	Grupo ETDRS nível 10 n=30	Diferença Média ( $\mu\text{m}$ )	IC de 95% (LI;LS)	Grupo ETDRS nível 20-35 n=43	Diferença Média ( $\mu\text{m}$ )	IC de 95% (LI;LS)	Grupo Controlo n=56	Valor p*
CFN	62.74±4.8*	2.41	0.1; 4.8	64.17±6.0	0.84	-1.3; 3.0	66.74±4.4	0.050
CCG/CPI	37.46±4.6*	4.00	1.1; 6.9	39.03±4.5	2.58	-0.1; 5.2	39.87±3.4	<b>0.003</b>
CNI	30.79±2.1	0.20	-1.2; 1.5	30.47±2.7	0.51	-0.7; 1.7	30.98±2.1	0.598
CPE	26.92±2.4	-0.55	-1.6; 0.5	26.49±1.7	-0.11	-1.1; 0.9	26.38±1.7	0.458
CNE/SIF	72.74±5.6	0.60	-2.9; 4.1	74.26±6.5	-0.92	-4.0; 2.2	73.35±5.9	0.556
SEF	36.61±3.3	-1.94	-4.3; 0.5	35.35±5.3	-0.67	-2.8; 1.5	34.68±3.5	0.149
EPR	23.94±2.9	2.02	0.2; 3.9	23.40±3.6	2.56	0.9; 4.2	25.96±3.1 <sup>†</sup>	<b>0.001</b>

\* p de ANOVA; †significativamente diferente de ETDRS <20 e de ETDRS 20-35; ‡significativamente diferente de controlos. IC – Intervalo de Confiança (LI – limite inferior; LS – limite superior). CFN – camada fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI – camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa/segmento interno fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentar da retina.

No grupo ETDRS nível 20-35 apenas a espessura do epitélio pigmentado da retina foi significativamente menor ( $p=0.001$ ).

As diferenças encontradas entre o grupo ETDRS nível 10 e o grupo ETDRS nível 20-35 não atingiram significância estatística em nenhuma das camadas analisadas.

#### **5.4. Comparação da espessura das camadas da retina (SD-OCT) com os parâmetros funcionais (ERGmf) na área macular central**

Na área macular central do SD-OCT foi avaliada a espessura das camadas da retina, que se encontra representada na tabela 8. No anel 1 do ERGmf foram registados o tempo de latência e amplitude de P1. Como referido anteriormente, os valores encontrados foram comparados com as bases normativas para detetar alteração (aumento ou diminuição). No ERGmf, considerou-se alteração quando o tempo de latência é superior a 45.47ms e a amplitude inferior a 102.53nV/deg<sup>2</sup>.

No grupo ETDRS nível 10, 34.3% dos doentes apresentaram alteração do ERGmf, no anel 1 quando comparados com o grupo controlo. Destes, 33.3% dos doentes tinham um aumento da espessura macular central da retina e 41.7% tinham um aumento da espessura das camadas nuclear interna e plexiforme externa. Observou-se, ainda, diminuição das camadas dos segmentos externos dos fotorreceptores e das fibras nervosas em 66.7% e 33.3% dos doentes, respetivamente.

No grupo ETDRS nível 20-35 observou-se alteração do ERGmf no anel 1 em 65.7% de doentes. Destes, 26.1% apresentaram um aumento da espessura total, 56.5% aumento de espessura da camada nuclear interna, 26.1% aumento da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna e 52.2% aumento da camada plexiforme externa. Por outro lado, observou-se uma diminuição da espessura das camadas dos fotorreceptores em 73.9% e das fibras nervosas em 39.1% dos doentes.



Tabela 8 – Espessura das camadas da retina ( $\mu\text{m}$ ) dos doentes diabéticos com mfERG alterado na área foveal, diferença média comparativamente ao grupo controlo.

Camada	ETDRS nível 10 n=12	Diferença Média ( $\mu\text{m}$ )	IC de 95% (LI;LS)	ETDRS nível 20-35 n=23	Diferença Média ( $\mu\text{m}$ )	IC de 95% (LI;LS)	Controlos n=56	Valor p *
<b>CFN</b>	7.21 $\pm$ 4.4	-0.57	-3.4; 2.3	4.71 $\pm$ 3.7	1.93	-0.3; 4.2	6.64 $\pm$ 3.3	0.065
<b>CCG/CPI</b>	40.91 $\pm$ 10.1	2.56	-3.9; 9.0	45.70 $\pm$ 7.6	-2.22	-7.3; 2.9	43.48 $\pm$ 7.9	0.250
<b>CNI</b>	21.17 $\pm$ 5.1	-4.04	-8.2; 0.1	22.60 $\pm$ 6.0*	-5.47	-8.7; -2.2	17.12 $\pm$ 4.8	<b>&lt;0.001</b>
<b>CPE</b>	25.09 $\pm$ 5.6	-3.24	-10; 3.5	29.22 $\pm$ 13.8*	-7.37	-12.7; -2.0	21.85 $\pm$ 5.0	<b>0.005</b>
<b>CNE/SIF</b>	116.25 $\pm$ 11.1	-2.92	-11.2; 5.3	110.09 $\pm$ 13.5	3.23	-3.2; 9.7	113.33 $\pm$ 8.2	0.229
<b>SEF</b>	38.26 $\pm$ 6.9	7.27	3.6; 10.9	39.29 $\pm$ 6.3	6.25	3.4; 9.1	45.23 $\pm$ 2.3 <sup>†</sup>	<b>&lt;0.001</b>
<b>EPR</b>	28.78 $\pm$ 4.4	-3.83	-7.0; -0.7	28.57 $\pm$ 5.5	-3.61	-6.1; -1.1	24.95 $\pm$ 2.8 <sup>†</sup>	<b>&lt;0.001</b>
<b>RT</b>	277.67 $\pm$ 20.5	-4.77	-22.1; 12.6	280.16 $\pm$ 28.3	-7.26	-20.9; 6.4	272.90 $\pm$ 18.4	0.410

\* p de ANOVA; †significativamente diferente de ETDRS <20 e de ETDRS 20-35; ♦significativamente diferente de controlos. IC – Intervalo de Confiança (LI – limite inferior; LS – limite superior). CFN – camada fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI – camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa/segmento interno fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentar da retina; RT – retina total.

## 5.5. Diferença do eletrorretinograma multifocal entre V2 e a V1

### 5.5.1. Tempo de latência

Nos doentes do grupo ETDRS nível 10 verificou-se, aos 24 meses, uma diminuição dos valores médios do tempo de latência (ms) da onda P1 nos anéis 1, 2 e 3, embora não estatisticamente significativa ( $p > 0.216$ ) (figura 16).

Esta diminuição do tempo de latência observou-se em 66.6% dos doentes no anel 1, em 53.3% dos doentes no anel 2 e em 60.0% dos doentes no anel 3.

Nos doentes diabéticos do grupo ETDRS nível 20-35 observaram-se valores médios do tempo de latência da onda P1 semelhantes em ambas as visitas (v1 e v2). No entanto, 62.8% dos doentes diminuíram o tempo de latência no anel 1, 53.5% no anel 2 e 69.8% no anel 3.

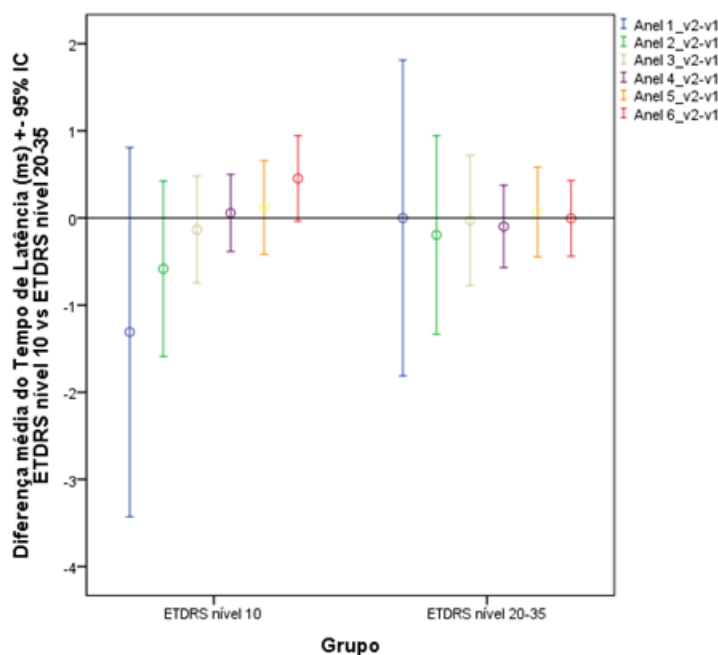


Figura 16 – Representação gráfica da diferença média do tempo de latência (ms) de P1,  $\pm 95\%$ IC, entre o grupo ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35 por anel. Significância testada com teste *t-Students*.

### 5.5.2. Amplitude

Relativamente à diferença dos valores médios de amplitude da onda P1 entre visitas, os doentes do grupo ETDRS nível 10 apresentaram um ligeiro aumento da amplitude média na V2 comparativamente à V1 em todos os anéis (figura 17). Embora não estatisticamente significativo ( $p>0.514$ ), este aumento observou-se em 60.0% dos doentes no anel 1, em 53.3% no anel 2 e em 56.7% no anel 3.

Por outro lado, o grupo ETDRS nível 20-35 apresentou uma diminuição da amplitude média apenas no anel 1. Embora não significativa ( $p=0.297$ ), esta diminuição observou-se em 58.1%.

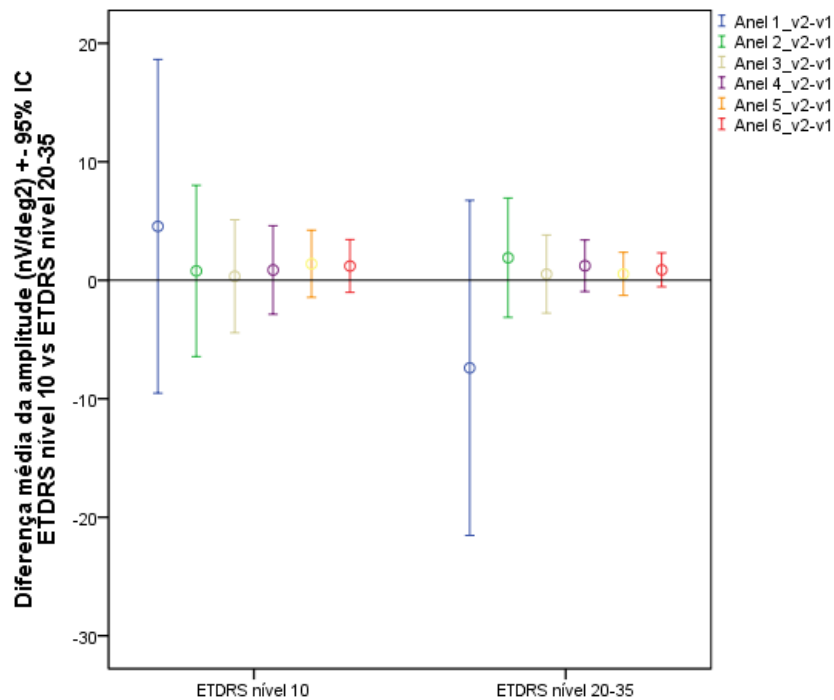


Figura 17 – Representação gráfica da diferença média da Amplitude ( $nV/deg^2$ ) de P1,  $\pm 95\%IC$ , entre o grupo ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35 por anel. Significância testada com teste *t-Students*.

## 5.6. Diferença na tomografia de coerência ótica entre V2 e V1

### 5.6.1. Diferença média de espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel central dos doentes diabéticos

Quanto às diferenças entre v2 e v1 na espessura das camadas da retina no anel central (figura 18), verificou-se no grupo ETDRS nível 10 uma diminuição, não estatisticamente significativa, da camada nuclear externa-segmento interno dos fotorreceptores ( $1.56\mu\text{m}$ ,  $p=0.103$ ) e uma diminuição estatisticamente significativa do epitélio pigmentado da retina ( $1.50\mu\text{m}$ ,  $p=0.010$ ). Verificou-se, ainda, um aumento da camada dos segmentos externos dos fotorreceptores de  $1.41\mu\text{m}$  ( $p=0.117$ ), não significativo.

No grupo ETDRS nível 20-35 ocorreu uma diminuição de todas as camadas analisadas, à exceção do epitélio pigmentado da retina, aos 24 meses. A diminuição observada na camada nuclear interna foi estatisticamente significativa ( $1.19\mu\text{m}$ ,  $p=0.038$ ).

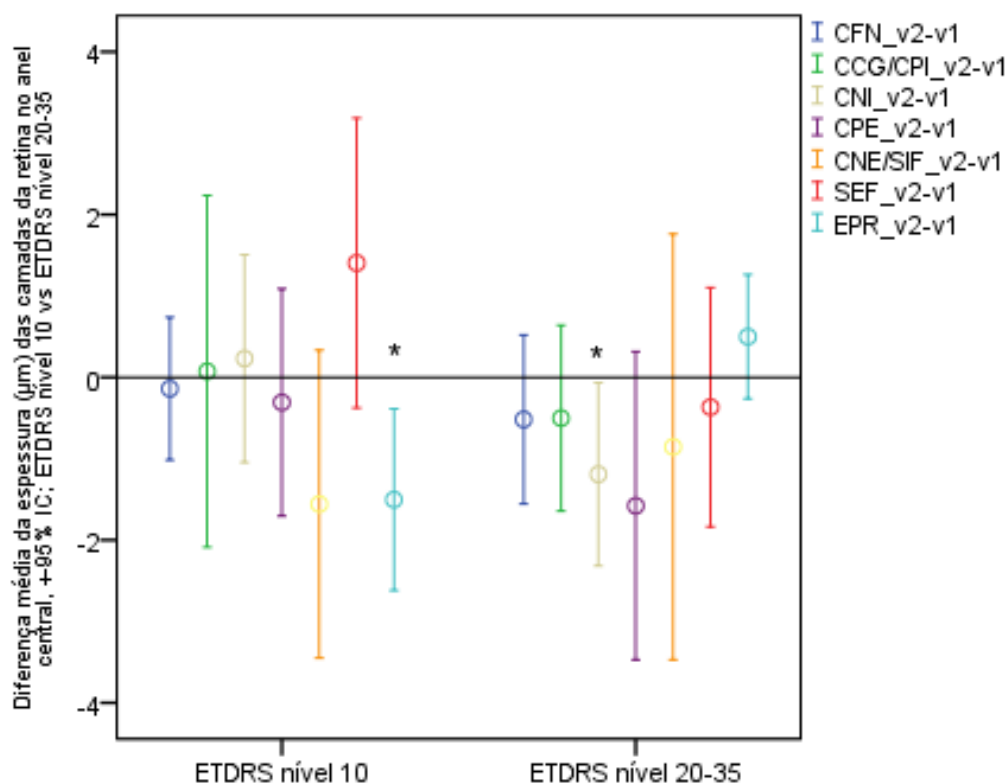


Figura 18 – Representação gráfica da diferença média da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel central, com IC de 95% entre visitas nos grupos ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35. \*  $p < 0.05$ , teste *t-Student*. CFN – camada de fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI- camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa-segmento interno dos fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentado da retina.

### 5.6.2. Diferença média de espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel interno dos doentes diabéticos

Na parafovea, no grupo ETDRS nível 10, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa na espessura da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna ( $1.02\mu\text{m}$ ,  $p=0.005$ ) após 24 meses.

No grupo ETDRS nível 20-35 a maior diferença entre visitas ocorreu na camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores ( $1.68\mu\text{m}$ ,  $p=0.138$ ), embora não significativa. Houve diminuição da espessura em todas as camadas analisadas, à exceção do epitélio pigmentado da retina. Nenhuma diferença encontrada atingiu significância estatística (figura 19).

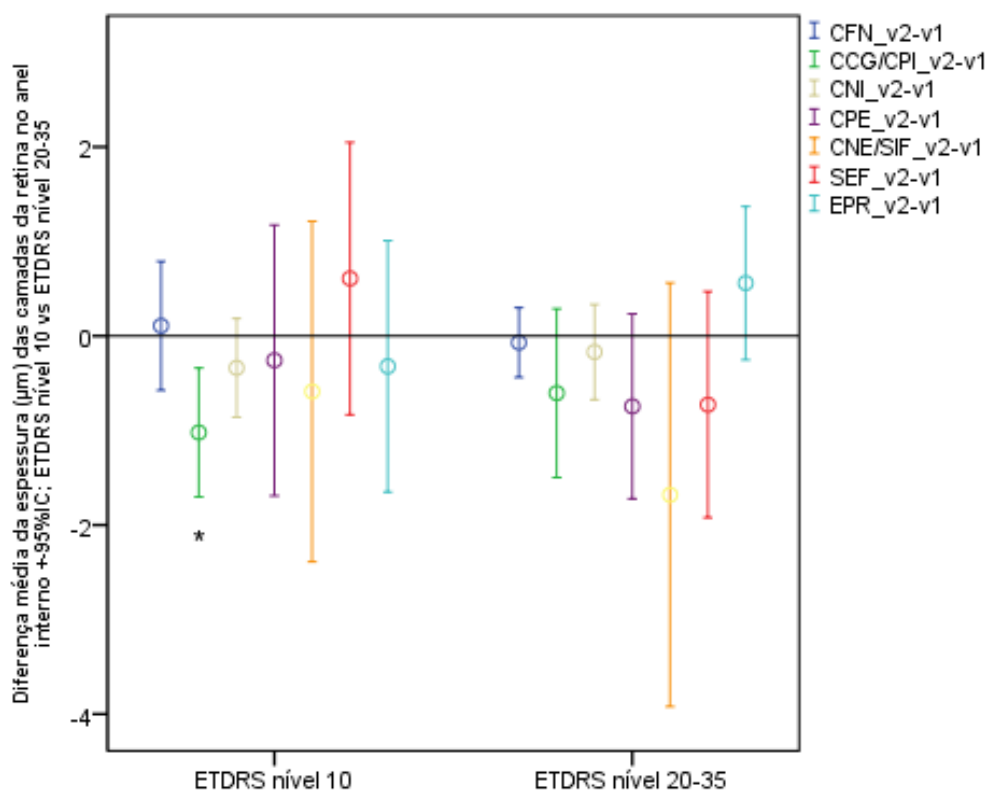


Figura 19 – Representação gráfica da diferença média da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel interno, com IC de 95% entre visitas nos grupos ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35; \*  $p < 0.05$ , teste *t-Student*. CFN – camada de fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI- camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa-segmento interno dos fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentado da retina.

### 5.6.3. Diferença média de espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel externo dos doentes diabéticos

Na perifovea observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da espessura da camada das células ganglionares/camada plexiforme interna ( $0.94\mu\text{m}$ ,  $p=0.001$ ) e da camada nuclear interna ( $0.33\mu\text{m}$ ,  $p=0.013$ ) ao fim de 24 meses, no grupo ETDRS nível 10.

No grupo ETDRS nível 20-35, as diferenças de espessura das camadas da retina entre v2 e v1 não foram estatisticamente significativas. Neste grupo de doentes, a camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores apresenta a diminuição mais acentuada, sem atingir significância estatística ( $1.43\mu\text{m}$ ,  $p=0.056$ ), (figura 20).

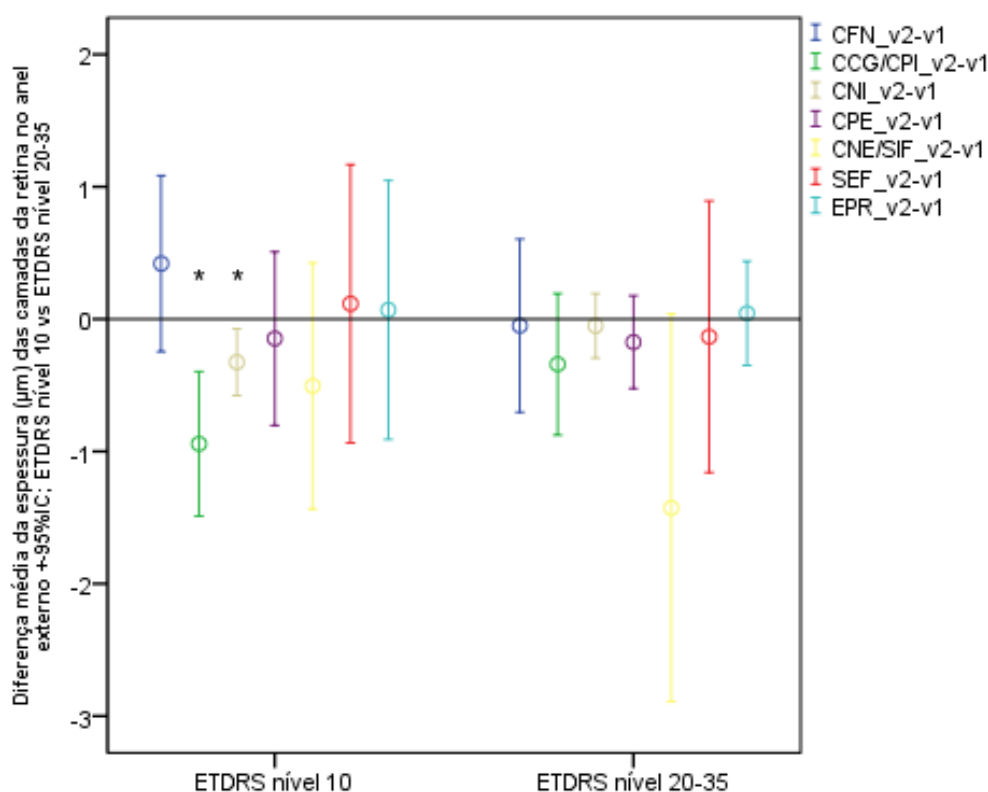


Figura 20 – Representação gráfica da diferença média da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das camadas da retina no anel externo, com IC de 95% entre visitas nos grupos ETDRS nível 10 e ETDRS nível 20-35. \*  $p < 0.05$ , teste *t-Student*. CFN – camada de fibras nervosas; CCG/CPI – camada células ganglionares/camada plexiforme interna; CNI- camada nuclear interna; CPE – camada plexiforme externa; CNE/SIF – camada nuclear externa-segmenro interno dos fotorreceptores; SEF – segmento externo dos fotorreceptores; EPR – epitélio pigmentado da retina.

## 5.7. Correlações entre as variáveis analisadas

Foi analisada a existência de correlação entre as variáveis do ERGmf (tempo de latência de P1 (ms) e amplitude de P1 (nV/deg<sup>2</sup>)) e do SD-OCT (espessura (µm) das camadas da retina) com a duração da DM (anos) e o valor de HbA1c (%), aos 24 meses de seguimento.

### 5.7.1. Correlações no Grupo ETDRS nível 10

No grupo ETDRS nível 10, verificou-se uma correlação negativa e moderada entre a duração da DM (anos) e a espessura (µm) do EPR na área foveal ( $r = -0.431$ ,  $p = 0.018$ ) e na área parafoveal ( $r = -0.427$ ,  $p = 0.018$ ), (figura 21).

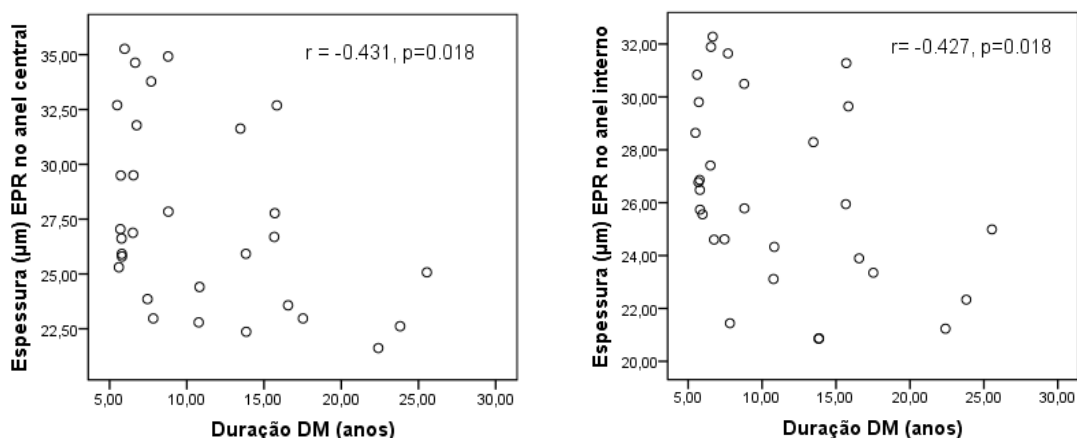


Figura 21 – Correlação entre a duração da Diabetes Mellitus (DM) em anos e a espessura (µm) do Epitélio Pigmentado da Retina na fóvea (imagem à esquerda) e na parafovea (imagem à direita), no grupo ETDRS nível 10, na v2.

O valor de HbA1c (%) correlacionou-se de forma negativa e moderada com a espessura (µm) da camada nuclear interna na área foveal ( $r = -0.441$ ,  $p = 0.015$ ) e a espessura (µm) da camada de fibras nervosas na área parafoveal ( $r = -0.362$ ,  $p = 0.049$ ), (figura 22).

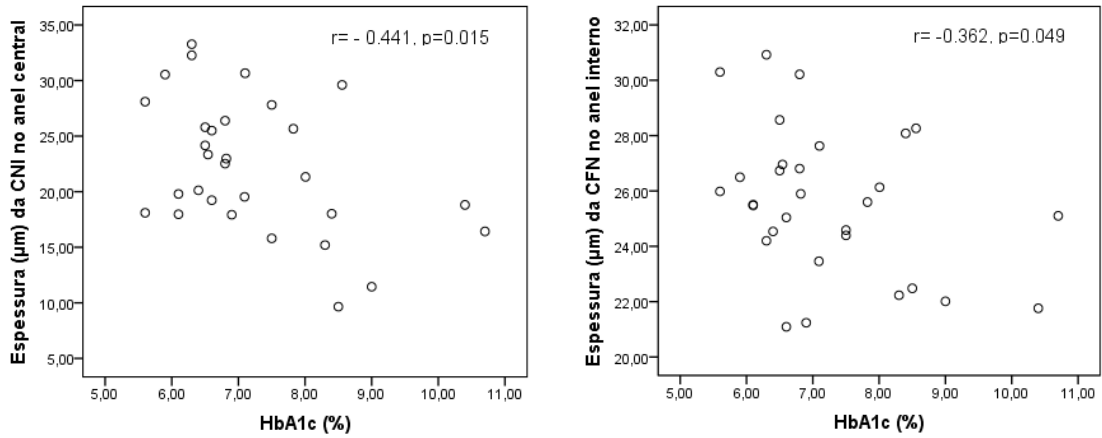


Figura 22 – Correlação entre a Hemoglobina Glicada (%) e a espessura (µm) da camada nuclear interna (CNI) na área foveal (imagem à esquerda). Correlação entre a Hemoglobina Glicada (%) e a espessura (µm) da camada de fibras nervosas (CFN) na área parafoveal (imagem à direita), no grupo ETDRS nível 10, na v2.

Na área foveal o tempo de latência (ms) da onda P1 correlacionou-se de forma negativa e moderada com a espessura (µm) do epitélio pigmentado da retina ( $r = -0.426$ ,  $p = 0.019$ ), (figura 23).

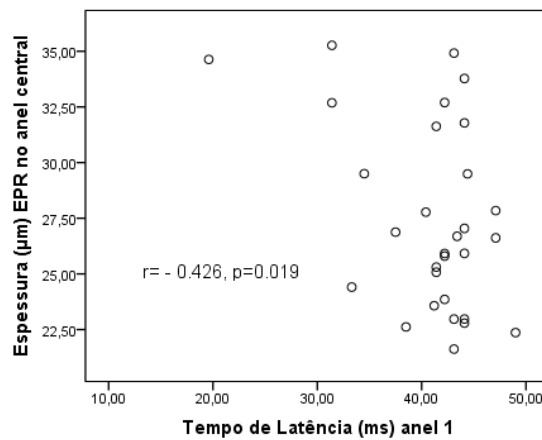


Figura 23 – Correlação entre tempo de latência (ms) e a espessura (µm) do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) na área foveal, no grupo ETDRS nível 10, na v2.



Na área perifoveal, o tempo de latência (ms) correlacionou-se de forma negativa e moderada com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores ( $r = -0.403$ ,  $p = 0.027$ ) e do EPR ( $r = -0.426$ ,  $p = 0.019$ ), (figura 24).

Na área parafoveal, a amplitude ( $\text{nV}/\text{deg}^2$ ) da onda P1 correlacionou-se de forma

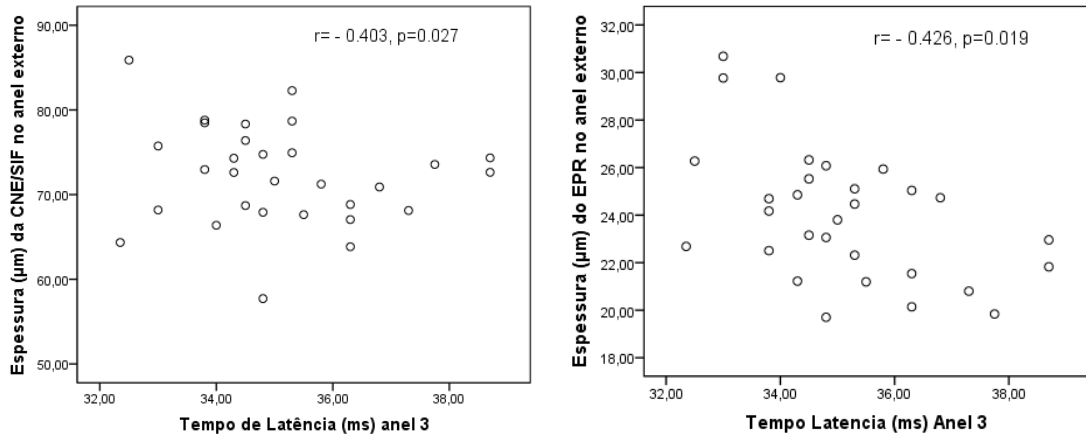


Figura 24 – Correlação entre o tempo de latência (ms) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/Segmento interno dos fotorreceptores (CNE/SIF) (imagem à esquerda) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) (imagem à direita) na área perifoveal, no grupo ETDRS nível 10, na v2.

positiva e moderada com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna ( $r = 0.409$ ,  $p = 0.025$ ) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores ( $r = 0.370$ ,  $p = 0.044$ ), (figura 25). Na área parafoveal, a amplitude ( $\text{nV}/\text{deg}^2$ ) correlacionou-se, ainda, de forma negativa e moderada com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada plexiforme externa ( $r = -0.370$ ,  $p = 0.044$ ), (figura 26).

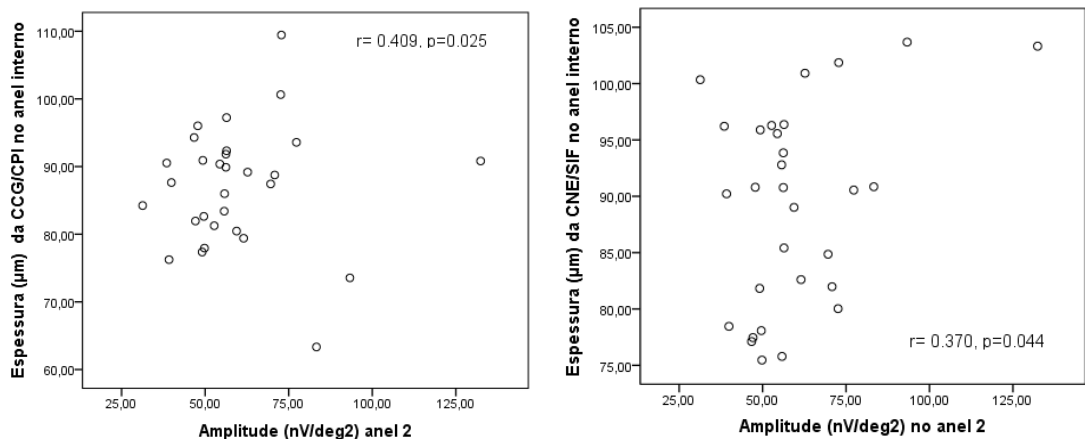


Figura 25 – Correlação entre a amplitude ( $\text{nV}/\text{deg}^2$ ) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem à esquerda) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/segmento interno fotorreceptores (CNE/SIF) (imagem à direita), na área parafoveal, no grupo ETDRS nível 10, na v2.

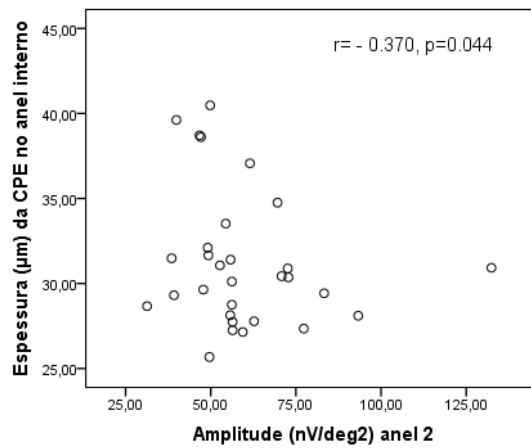


Figura 26 – Correlação entre a amplitude (nv/deg<sup>2</sup>) e a espessura (µm) da camada plexiforme externa (CPE) na área parafoveal, no grupo ETDRS nível 10, nav2.

Na área perifoveal, a amplitude (nV/deg<sup>2</sup>) correlacionou-se de forma positiva e moderada com a espessura (µm) da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna (r=0.531, p=0.003), da camada nuclear interna (r=0.367, p=0.046) e da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores (r=0.398, p= 0.030), aos 24 meses de seguimento, (figura 27).

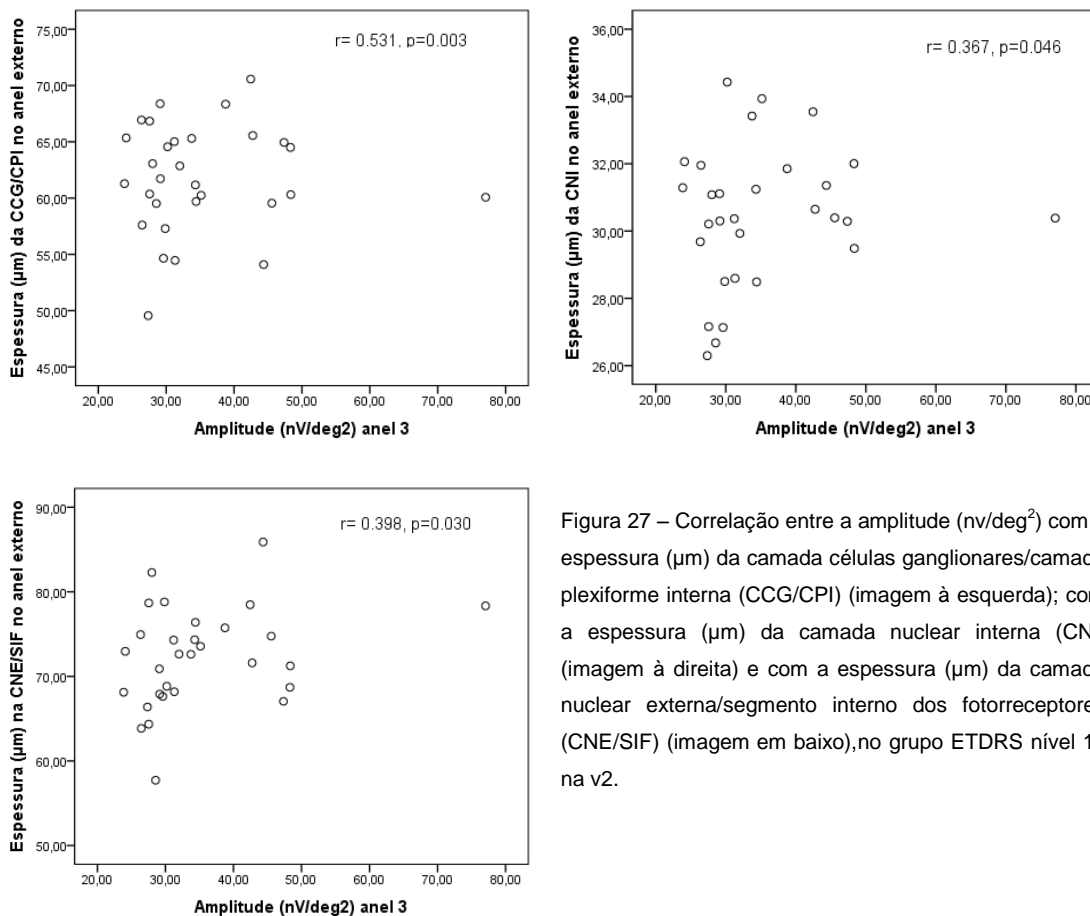


Figura 27 – Correlação entre a amplitude (nv/deg<sup>2</sup>) com a espessura (µm) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem à esquerda); com a espessura (µm) da camada nuclear interna (CNI) (imagem à direita) e com a espessura (µm) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores (CNE/SIF) (imagem em baixo),no grupo ETDRS nível 10 na v2.

### 5.7.2. Correlações no Grupo ETDRS nível 20-35

No grupo ETDRS nível 20-35 a duração da DM (anos), correlacionou-se de forma positiva e moderada com o tempo de latência (ms) de P1 ( $r=0.348$ ,  $p=0.022$ ) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada plexiforme externa ( $r=0.470$ ,  $p=0.001$ ) na área foveal (figura28).

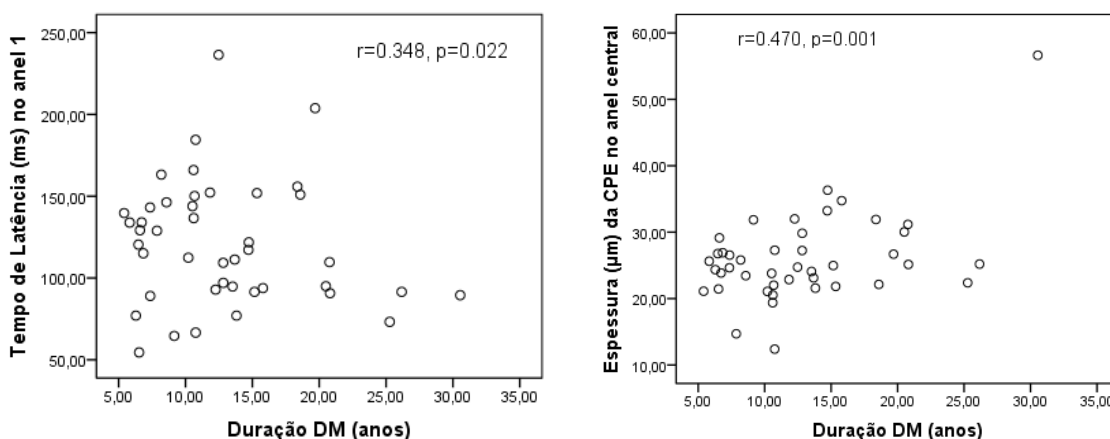


Figura 28 – Correlação entre duração da Diabetes Mellitus (DM) com o tempo de latência (ms) (imagem à esquerda) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada plexiforme externa (CPE) (imagem à direita) na fóvea, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.

Nas áreas para e perifoveais, a duração média da DM (anos) correlacionou-se de forma negativa e moderada com e a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna ( $r= -0.364$ ,  $p=0.016$  e  $r= -0.448$ ,  $p=0.003$ , respetivamente) e da camada nuclear interna ( $r= -0.348$ ,  $p=0.022$  e  $r= -0.410$ ,  $p=0.006$ , respetivamente), aos 24 meses de seguimento, (figuras 29 e 30).

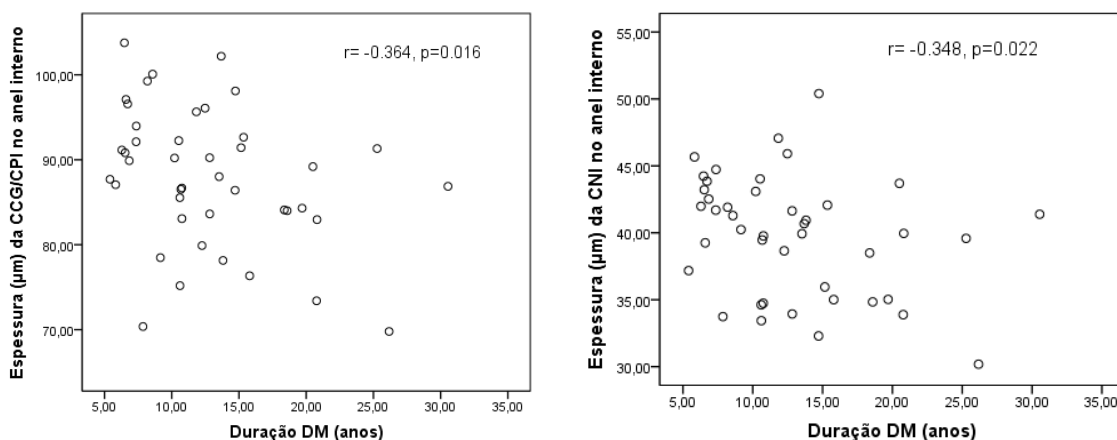


Figura 29 – Correlação entre duração da Diabetes Mellitus (DM) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem à esquerda) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear interna (CNI) no anel interno (imagem à direita), na área parafoveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.

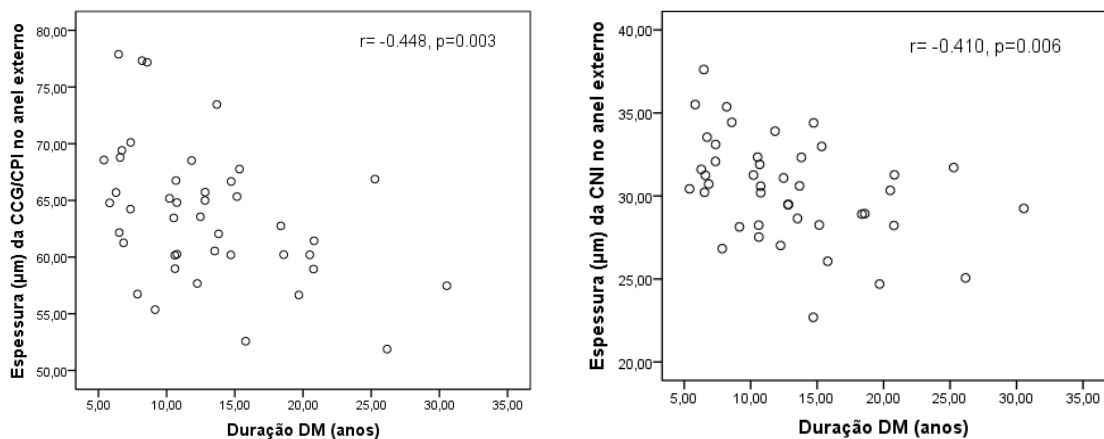


Figura 30 – Correlação entre duração da Diabetes Mellitus (DM) com a espessura (µm) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem à esquerda) e com a espessura (µm) da camada nuclear interna (CNI) (imagem à direita), na área perifoveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.

A duração da diabetes (anos), também se correlacionou de forma negativa e fraca com a espessura (µm) da camada de fibras nervosas ( $r = -0.310$ ,  $p = 0.043$ ), na área perifoveal.

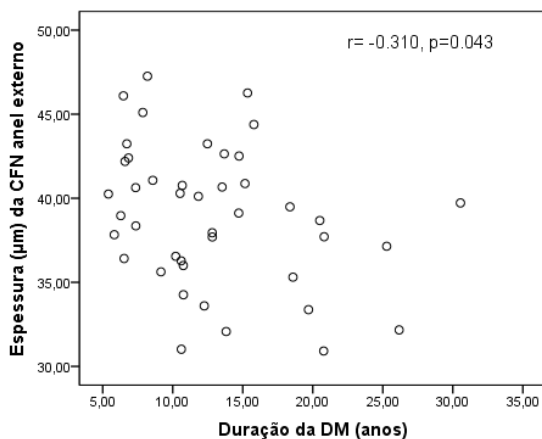


Figura 31 – Correlação entre duração da Diabetes Mellitus (DM) com a espessura (µm) da camada de fibras nervosas (CFN) no anel externo, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.

O valor de HbA1c (%) correlacionou-se de forma positiva e moderada com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada plexiforme externa ( $r=0.488$ ,  $p=0.001$ ) e de forma negativa e moderada com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) do epitélio pigmentado da retina ( $r= -0.360$ ,  $p=0.018$ ) na área foveal (figura 32), aos 24 meses de seguimento.

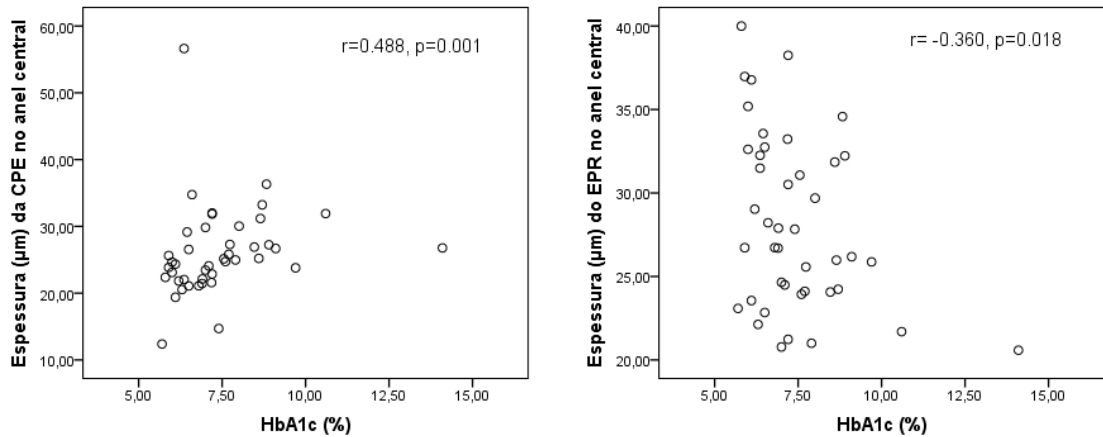


Figura 32 – Correlação entre hemoglobina glicada (HbA1c) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada plexiforme externa (CPE) (imagem à esquerda) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da epitélio pigmentado da retina (EPR) no (imagem à direita), na área foveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.

Na área parafoveal, o valor de HbA1c (%) correlacionou-se de forma negativa e moderada com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores ( $r= -0.389$ ,  $p=0.010$ ) e do epitélio pigmentado da retina ( $r= -0.360$ ,  $p=0.018$ ), aos 24 meses de seguimento (figura 33).

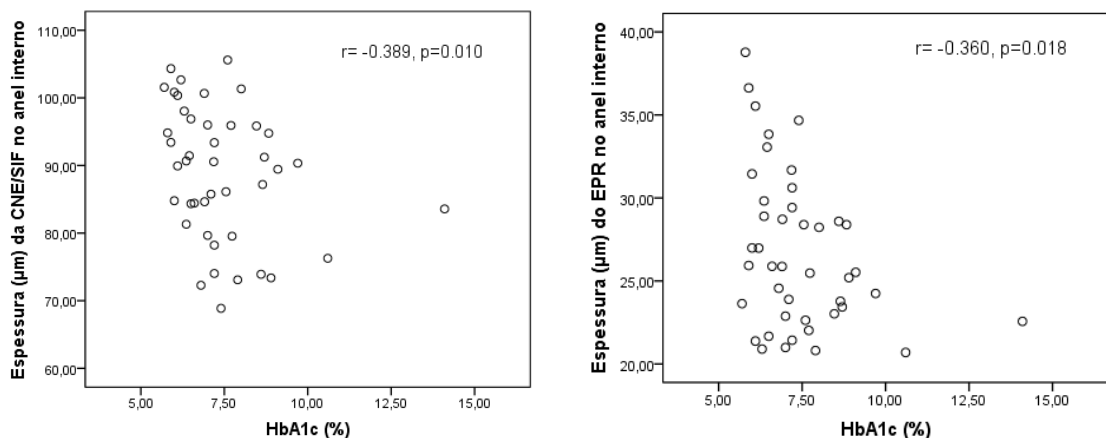


Figura 33 – Correlação entre hemoglobina glicada (HbA1c) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores (CNI/SEF) (imagem à esquerda) e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) do epitélio pigmentado da retina (EPR) (imagem à direita), na área parafoveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.

Na área perifoveal a HbA1c (%) também se correlacionou de forma negativa e moderada com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores ( $r = -0.358, p=0.019$ ), aos 24 meses de seguimento (figura 34).

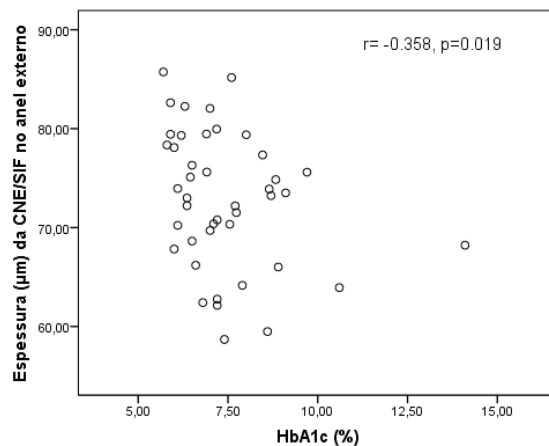


Figura 34 – Correlação entre hemoglobina glicada (HbA1c) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores (CNI/SEF) na área perifoveal, no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.

O tempo de latência (ms) da onda P1 no ERGmf no grupo ETDRS nível 20-35 correlacionou-se de forma negativa e moderada com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada de fibras nervosas na área foveal ( $r = -0.390, p=0.010$ ) e de forma positiva e fraca com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) do epitélio pigmentado da retina na área parafoveal ( $r=0.342, p=0.025$ ), aos 24 meses de seguimento (figura 35).

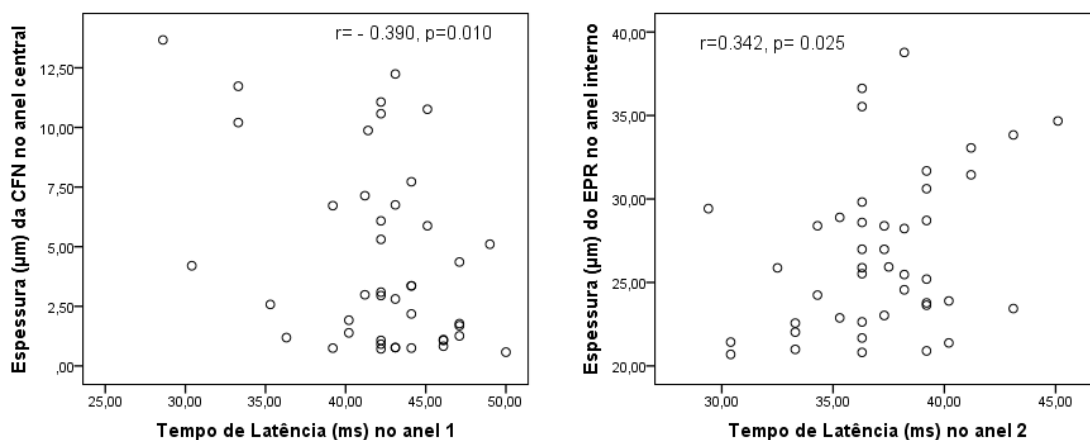


Figura 35 – Correlação entre o tempo de latência (ms) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada de fibras nervosas (CFN) (imagem à esquerda) na área foveal, e com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) do epitélio pigmentado da retina (EPR) na área parafoveal (imagem à direita), no grupo ETDRS nível 20-35 na v2.

A amplitude ( $\text{nV/deg}^2$ ) da onda P1 correlacionou-se de forma positiva e moderada com a média de espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna ( $r=0.379$ ,  $p=0.012$ ), da camada nuclear interna ( $r=0.419$ ,  $p=0.005$ ) e da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores ( $r=0.398$ ,  $p=0.008$ ) na área parafoveal, e ainda com a espessura da camada nuclear interna ( $r=0.305$ ,  $p=0.047$ ) na área perifoveal, aos 24 meses de seguimento (figura 36).

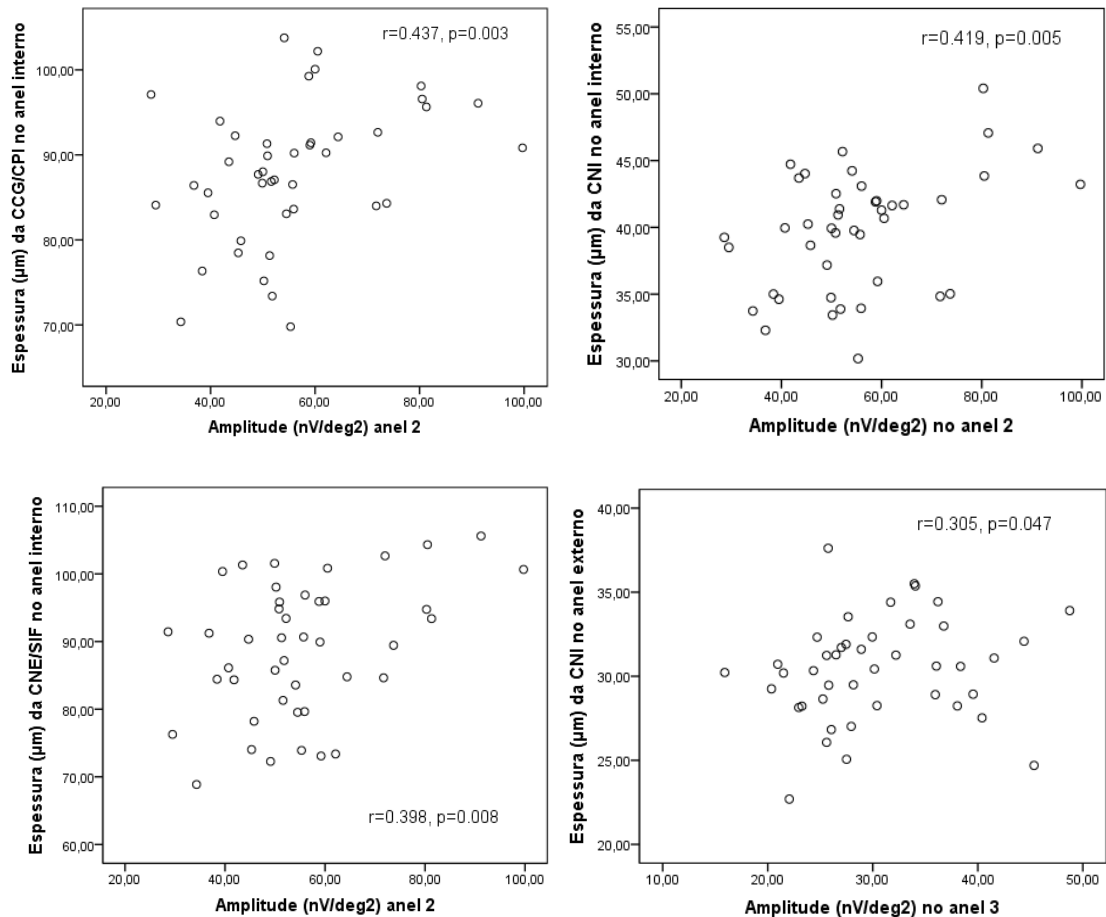


Figura 36 – Correlação entre amplitude ( $\text{nV/deg}^2$ ) com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada células ganglionares/camada plexiforme interna (CCG/CPI) (imagem superior esquerda), com a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear interna (CNI) (imagem superior direita) e com a camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores (CNE/SEF) (imagem inferior esquerda), na área parafoveal, e a espessura ( $\mu\text{m}$ ) da camada nuclear interna (CNI) na área perifoveal, (imagem inferior direita), no grupo ETDRS nível 20-35, na v2.





## 6. Discussão

A RD é uma das principais causas de cegueira no mundo ocidental em indivíduos em idade ativa. Desta forma, a detecção e tratamento precoces são importantes para reduzir a morbidade, melhorar a qualidade de vida do doente diabético e diminuir os custos económicos.

A microangiopatia tem sido apontada como a principal alteração que ocorre na RD e a responsável por perdas graves da função visual. No entanto, estudos recentes mostram que pode existir neurodegeneração antes de surgirem as lesões microvasculares <sup>(5, 6, 25, 30, 31)</sup>. Desta forma, é importante a detecção e avaliação precoce desta neurodegeneração para investigar novos tratamentos que possam travar a progressão da doença e as consequências na visão.

Neste estudo, usando o SD-OCT e o ERGmf, e um grupo de indivíduos saudáveis sem DM como grupo de controlo, foi possível observar que a DM tem um efeito neurodegenerativo precoce nas diferentes camadas da retina, que está presente mesmo sem que o componente vascular da RD se tenha manifestado ou permaneça mínimo.

Os resultados do ERGmf mostraram que a função retiniana está significativamente alterada nos doentes diabéticos comparativamente aos indivíduos saudáveis, apresentando de uma forma geral um aumento do tempo de latência da onda P1 e uma diminuição da amplitude da onda P1. Estas alterações foram mais pronunciadas nos doentes com RDNP ligeira do que nos doentes sem RD (53.5% vs 40.0%, respetivamente), o que demonstra uma possível lesão e perda neuronal à medida que a patologia microvascular se instala. Os nossos resultados vão de encontro a outros já publicados, que referem um aumento significativo no tempo de latência e diminuição de amplitude da onda P1 em doentes diabéticos sem RD e com RDNP ligeira, quando comparados com indivíduos sem DM <sup>(59, 92, 107)</sup>.

No presente estudo, foi também observado que o tempo de latência e a amplitude da onda P1 diminuem com a excentricidade retiniana, sendo maior no anel central (anel 1) diminuindo para a periferia (anel 2 a 6). Este achado é facilmente explicado com as diferenças de distribuição das células retinianas responsáveis pela resposta à luz, ou seja, por se encontrar um maior número de cones e células bipolares na região central que vai diminuindo com a excentricidade retiniana <sup>(99)</sup>. Também

observamos um aumento significativo do tempo de latência da onda P1 e uma diminuição significativa da amplitude da onda P1 nos 4 anéis mais periféricos do ERGmf em ambos os grupos de doentes diabéticos. Reis *et al.* <sup>(106)</sup>, num estudo realizado em diabéticos sem RD e com RDNP ligeira, obtiveram resultados idênticos, que mostraram um aumento do tempo de latência no anel 2 e uma diminuição da amplitude da onda P1 em todos os anéis do ERGmf nos grupos de diabéticos que estudaram.

Alguns estudos sugerem que, para avaliar a função retiniana em doentes diabéticos, a característica temporal (tempo de latência) da onda P1 é mais importante do que a amplitude <sup>(94, 104, 108)</sup>. Os investigadores acreditam que os doentes diabéticos têm alterações temporais indicando atraso da transmissão neuronal devido ao comprometimento local provocado pela hiperglicemia. O aumento do tempo de latência pode ser indicador do desenvolvimento das alterações microvasculares da RD e correlacionar-se com o seu grau de gravidade <sup>(5)</sup>. Esta observação sublinha uma ligação entre a disfunção neuronal e a lesão microvascular. Fortune *et al.* <sup>(104)</sup> demonstraram que o tempo de latência da onda P1 em áreas localizadas com alterações visíveis de RD foi consideravelmente mais lento em comparação com indivíduos sem DM. Verificaram, também, que o tempo de latência da onda P1 em zonas adjacentes a áreas com alterações de RD também se encontrava aumentado, considerando assim que o ERGmf é sensível na deteção local de disfunção retiniana, mesmo antes das lesões clínicas de RD se tornarem evidentes. Por outro lado, outros estudos têm enfatizado a importância de ambas as componentes do ERGmf na identificação de défices funcionais retinianos na RD <sup>(102)</sup>. Neste trabalho, constatamos que a diminuição da amplitude da onda P1 foi mais sensível na deteção de disfunção neuronal e mais frequentemente observada nos doentes diabéticos com maior gravidade de lesões vasculares de RD.

O nosso trabalho incidiu na avaliação dos componentes da onda P1 no ERGmf, mas também na análise quantitativa das camadas da retina usando o SD-OCT e um *software* para segmentação das camadas. De uma forma geral, este estudo longitudinal revelou diferenças significativas na espessura de várias camadas da retina (diminuição ou aumento) entre o grupo controlo e os doentes diabéticos.

Na área macular central, foi constatado um aumento da espessura da camada nuclear interna e da plexiforme externa nos doentes diabéticos e, no grupo com RDNP ligeira, também se observou um aumento da espessura da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna. Resultados semelhantes foram observados por

Bandello *et al* (2015) num grupo de doentes diabéticos com RDNP. Estes achados sugerem que, nas fases iniciais da RD, o edema macular, resultante da rotura da BHR, se deve provavelmente à acumulação de fluido extracelular no plexo vascular profundo da retina <sup>(52, 113)</sup>. O aumento da espessura não envolve apenas uma camada, pois, embora o aumento da espessura seja mais significativo na camada nuclear interna, também se observou aumento da espessura nas camadas retinianas adjacentes, indicando um gradiente no aumento da espessura da retina, que pode ser explicado pela distribuição do fluido extracelular <sup>(113)</sup>. Uma maior espessura da camada plexiforme externa em doentes diabéticos com lesões microvasculares deve-se, provavelmente, a uma deterioração adicional da BHR e conseqüente aumento da permeabilidade vascular <sup>(68, 114)</sup>.

Nos doentes com DM observou-se uma diminuição da espessura da camada dos segmentos externos dos fotorreceptores quando comparada com a dos indivíduos sem DM. Resultados semelhantes foram obtidos por Tavares *et al* e Bandello *et al*, que observaram menor espessura na camada dos fotorreceptores de doentes diabéticos sem RD <sup>(25)</sup> e com RDNP <sup>(113)</sup> comparativamente a indivíduos sem DM. Os fotorreceptores são os neurónios com maior atividade metabólica do sistema nervoso central e representam também a maior parte da atividade metabólica da retina, influenciando a função de todos os outros tipos de células retinianas <sup>(115)</sup>; eliminam os produtos do seu metabolismo via coróide, através do epitélio pigmentado da retina. Desta forma, uma das hipóteses para a diminuição da espessura da camada dos segmentos externos dos fotorreceptores nos doentes diabéticos poderá ser a existência de alterações microvasculares da coróide que possam contribuir para a degeneração dos fotorreceptores. Efetivamente, alguns autores têm constatado que o efeito da hiperglicémia crónica na retina pode levar à perda de fotorreceptores, através de alterações na via de sinalização da insulina nestas células e diminuição da neuroprotecção <sup>(116)</sup>. No entanto, neste estudo não se observou correlação entre a diminuição da camada dos segmentos externos dos fotorreceptores e a duração da DM ou os valores de HbA1c.

Comparando-se os valores de espessura da retina na área macular central dos doentes diabéticos, individualmente, com os valores de referência usados neste trabalho, (254.5-291.3µm), constatou-se que estes valores estavam diminuídos em 16.7% e 13.8%, normais em 53.3% e 58.1%, e aumentados em 30.0% e 27.9% dos olhos sem RD e com RDNP ligeira, respetivamente. Uma diminuição do valor médio da espessura central da retina em diabéticos sem RD e um aumento da espessura central da retina na

fase de RDNP ligeira foram reportados por Oshitari *et al*, achado que os autores atribuíram ao processo neurodegenerativo precoce que ocorre na RD, precedendo as alterações microvasculares <sup>(117)</sup>. Neste trabalho observamos também, em 50.0% dos diabéticos sem RD e 56.0% com RDNP ligeira, e com valor de espessura normal na área foveal, uma alteração no anel 1 do ERGmf. Por outro lado, nos diabéticos com aumento de espessura na área foveal observou-se alteração no anel 1 do ERGmf em 44.4% dos diabéticos sem RD e em 50.0% dos diabéticos com RDNP ligeira. Portanto, nas fases iniciais da RD, a degeneração neuronal e a alteração da BHR podem ocorrer em graus variáveis, em indivíduos diferentes.

Nas áreas para e perifoveal da retina observou-se uma diminuição da espessura da camada de fibras nervosas e das células ganglionares/camada plexiforme interna em ambos os grupos de doentes diabéticos. Efetivamente, estudos que utilizam o SD-OCT para identificar alterações correspondentes ao processo neurodegenerativo precoce da RD, têm analisado principalmente as camadas mais internas da retina e revelado uma diminuição da espessura média da retina em doentes diabéticos sem RD ou com RDNP, comparativamente a indivíduos sem DM. Esta diminuição deve-se, maioritariamente, à diminuição da espessura da camada de fibras nervosas e do complexo das células ganglionares/camada plexiforme interna <sup>(92, 111, 118-121)</sup>, tal como por nós observado.

Após 24 meses de seguimento, o grupo de doentes diabéticos sem RD apresentou uma melhor resposta bioelétrica da retina, fundamentada pelo aumento da amplitude de P1 em 60.0% dos doentes e diminuição do tempo de latência de P1 em 66.6% dos doentes. Também se verificou, nestes doentes, uma diminuição da espessura das camadas nuclear interna e plexiforme externa e aumento da camada dos fotorreceptores. Por outro lado, no grupo de doentes diabéticos com RDNP ligeira constatou-se uma perda de células ganglionares, células bipolares e fotorreceptores na área foveal, observada através da diminuição das camadas internas da retina (CFN, CCG/CPE, CNI, CPE, CNE/SIF e SEF), bem como diminuição da amplitude de P1 (58.1% dos olhos). Portanto, nas fases iniciais da RD, a degeneração neuronal e a alteração da BHR podem efetivamente ocorrer em graus variáveis, em indivíduos diferentes. A degeneração neuronal, e conseqüente diminuição da espessura da retina, pode ser mascarada pela acumulação de fluido associado à alteração da BHR, resultando na aquisição de diferentes valores de espessura da retina nas fases iniciais da RD <sup>(122)</sup>. De uma forma geral, o fluido extracelular dispersa a luz dentro da retina e impede a focalização nos fotorreceptores, diminuindo desta forma a função visual. Do

ponto de vista celular, a função visual pode diminuir se a acumulação de fluido extracelular: alterar as concentrações iônicas necessárias para ativar os potenciais elétricos; comprimir os neurónios da retina; comprometer a conversão de glutamato em glutamina entre as células gliais e os neurónios necessários para a neurotransmissão; ou aumentar a suscetibilidade dos neurónios a aminoácidos citotóxicos, anticorpos ou células inflamatórias<sup>(88)</sup>.

A forma da onda do ERGmf é largamente moldada pela atividade das células bipolares, com contribuições mais pequenas dos fotorreceptores e das células amácrinas e ganglionares<sup>(108, 123)</sup>. Nos doentes sem RD, após uma evolução de 24 meses, quando se correlacionaram os achados funcionais (tempo de latência e amplitude da onda P1) e estruturais (espessura das camadas da retina), verificou-se a existência de uma correlação moderada entre o tempo de latência da onda P1 e a espessura da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores ( $r = -0.403$ ,  $p = (0.027)$ ), sugerindo comprometimento funcional ou perda de fotorreceptores (cones) na área foveal. Analisando as áreas adjacentes, parafoveal e perifoveal, a amplitude da onda P1 mostrou estar moderadamente correlacionada com a espessura da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores ( $r = 0.398$ ,  $p = 0.030$ ), camada nuclear interna ( $r = 0.367$ ,  $p = 0.046$ ) e camada de células ganglionares/camada plexiforme interna ( $r = 0.531$ ,  $p = 0.003$ ), sugerindo comprometimento neurofuncional dos fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares.

Por outro lado, nos doentes com RDNP ligeira (ETDRS nível 20-35) foi observada, na área foveal, uma correlação moderada entre o tempo de latência da onda P1 e a espessura da camada de fibras nervosas ( $r = -0.390$ ,  $p = 0.010$ ). Avaliando não só a resposta foveal mas também das áreas adjacentes, verificou-se nos anéis parafoveal e perifoveal a existência de uma correlação moderada entre a amplitude da onda P1 e a espessura da camada nuclear externa/segmento interno dos fotorreceptores ( $r = 0.398$ ,  $p = 0.008$ ), camada nuclear interna ( $r = 0.419$ ,  $p = 0.005$ ) e camada de células ganglionares/camada plexiforme interna ( $r = 0.437$ ,  $p = 0.003$ ), sugerindo alteração neurofuncional dos fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares, também neste grupo de doentes. Hood, no seu trabalho, refere que a DM apresenta mais que um nível de lesão retiniana e que a maior parte do ERGmf é diretamente gerado pelas células bipolares ou é devido à atividade da camada nuclear interna conduzida por estas células. Assim, a lesão nas células bipolares terá um efeito pronunciado no ERGmf e o efeito dependerá do mecanismo que gera a lesão<sup>(108)</sup>. Contudo, também está descrito

que a DM induz apoptose neuronal das células ganglionares, amácrinas e de Müller <sup>(7)</sup>, e que estes achados poderão preceder as lesões microvasculares <sup>(124)</sup>. As células gliais são moduladores do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular e da sobrevivência celular <sup>(5, 6)</sup>.

Outro resultado que merece ser comentado é que comparando a espessura da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna nos dois grupos de diabéticos, o grupo com alterações microvasculares visíveis à fundoscopia (ETDRS nível 20-35), apresentou uma espessura maior desta camada, apesar de apresentar menor amplitude da onda P1, o que se poderá explicar pela alteração da BHR, e consequente acumulação de fluido extracelular na camada nuclear interna e camadas adjacentes (camada de células ganglionares, plexiforme interna e externa). O aumento de espessura da retina envolve camadas progressivamente diferentes, com diferentes tipos de células, indicando que nenhuma célula específica é preferencialmente envolvida <sup>(113)</sup>. Em doentes com RDNP ligeira ocorre ativação da microglia e libertação de mediadores pró-inflamatórios provocando rotura vascular, disfunção glial e morte de células neuronais através da libertação de substâncias citotóxicas <sup>(125)</sup>.

Apesar dos mecanismos subjacentes à neurodegeneração não estarem ainda bem esclarecidos, sabe-se que a retina interna é nutrida pela circulação retiniana, sendo relativamente hipóxica em comparação com a retina externa primariamente nutrida pela circulação coroideia. Desta forma, a hipóxia na retina interna combinada com altas exigências metabólicas, torna a retina interna mais vulnerável ao stresse metabólico induzido pela diabetes <sup>(88)</sup>. Por outro lado, a menor disponibilidade de insulina nestes doentes, que seria um fator de sobrevivência para os neurónios da retina, diminuindo o risco de apoptose de células neurogliais induzida pela hiperglicémia e por produtos terminais de glicosilação avançada, pode ser outro mecanismo envolvido na vulnerabilidade das camadas celulares da retina interna <sup>(7)</sup>.

No presente estudo, observou-se que a duração da diabetes se correlaciona de forma negativa com a espessura das camadas internas da retina (CCG/CPI e CNI) e que os valores de HbA1c se correlacionam com a espessura das camadas externas da retina (EPR e CNE/SIF). Sohn *et al.* quantificaram a espessura das diferentes camadas da retina em doentes diabéticos sem RD e com RDNP ligeira ao longo de 4 anos e a possível influência da duração da DM e dos valores de HbA1c. Reportaram uma diminuição da camada de fibras nervosas de 0.25  $\mu\text{m}/\text{ano}$  e do complexo da camada de

células ganglionares/plexiforme interna de 0.29  $\mu$ /ano, não correlacionada com os valores de HbA1c, idade e sexo ou com a duração da DM <sup>(126)</sup>.

Embora a correlação entre a duração da DM e a espessura das camadas internas da retina observada neste estudo seja estatisticamente significativa, a hipótese de que a neurodegeneração retiniana é resultado direto da hiperglicemia crônica é discutível. Efetivamente, este estudo não mostrou uma correlação entre os níveis de HbA1c e a espessura das camadas internas da retina. No entanto, a ausência de correlação entre as alterações detetadas pelo ERGmf e pelo SD-OCT com os valores de HbA1c pode ser atribuída ao conceito de que os níveis de HbA1c avaliados num determinado momento não representam necessariamente a história anterior do controle metabólico do doente. Permanece em aberto quais os mecanismos, além da hiperglicemia crônica, que poderão causar a neurodegeneração retiniana que se observa em indivíduos diabéticos.

Os mecanismos moleculares envolvidos na neurodegeneração retiniana na diabetes são complexos e podem incluir uma combinação de fatores oculares, tais como o aumento do stresse oxidativo, perda de fatores neuroprotetores, inflamação, excitotoxicidade do glutamato e fatores sistêmicos incluindo a hiperglicemia, dislipidemia e deficiência de insulina <sup>(29)</sup>. Efetivamente, no nosso estudo os doentes diabéticos com RDNP ligeira apresentaram mais frequentemente co-morbilidades sistêmicas, como hipertensão arterial, aumento do colesterol total, aumento de triglicerídeos, maior IMC e PMA do que os diabéticos sem RD.

Outro fator a considerar quando interpretamos a alteração da espessura das camadas retinianas é a idade cronológica dos doentes. No nosso estudo, não foi encontrada correlação entre a idade e a espessura das camadas da retina. Demirkaya *et al* determinaram o efeito da idade na espessura das camadas da retina usando SD-OCT e estimaram que, em cada período de 20 anos, um indivíduo saudável perde aproximadamente 2.06 $\mu$ m na camada de células ganglionares pericentral, 0.92 $\mu$ m na camada plexiforme interna periférica e 1.76 $\mu$ m nos segmentos externos dos fotorreceptores na área foveal, enquanto o epitélio pigmentado da retina aumenta 1.32 $\mu$ m, em média <sup>(127)</sup>. No nosso estudo, no entanto, não foi encontrada correlação entre a idade e a espessura das camadas da retina.

Em suma, sabe-se que a função retiniana depende da sinergia de múltiplos neurónios, incluindo fotorreceptores, células bipolares, células horizontais, células

amácricas, células ganglionares, células da glia, mas também das células que fazem parte das BHR interna (células endoteliais e pericitos) e externa (EPR), que medeiam o suprimento de nutrientes e controlam o fluxo iónico <sup>(128, 129)</sup>, e da influência de vários fatores sistêmicos. A lesão e perda de tecido neuronal e consequente alteração da resposta funcional observada neste estudo é corroborada por estudos prévios, <sup>(90-95)</sup> que têm mostrado défices na função neuroretiniana em pacientes diabéticos, tais como a diminuição à adaptação ao escuro e da sensibilidade ao contraste, perda de discriminação cromática e alteração nos campos visuais, mesmo antes do aparecimento de lesões vasculares.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a microangiopatia afeta a resposta neurofuncional, mas que, em alguns casos, a resposta funcional poderá já estar comprometida antes do aparecimento de alterações microvasculares na fundoscopia. Desta forma, estudos futuros longitudinais prospetivos deverão ser realizados na tentativa de confirmar esta premissa, já que dois anos podem não ser suficientes para detetar alterações. Adicionalmente, sugerimos o recurso a outras técnicas de imagem não invasivas, tais como o Angio-OCT, que permite a avaliação e quantificação de alterações vasculares não visíveis na fundoscopia, como o alargamento da zona avascular da fóvea e a existência de áreas de não perfusão capilar na mácula.

Este estudo tem limitações, como é o tamanho relativamente pequeno da amostra e o facto da duração da doença poder ter sido subestimada nesta análise, uma vez que o início da DM tipo 2 é insidioso e poderão ter decorrido vários anos da doença até se estabelecer o diagnóstico, com base nos achados clínicos e analíticos.



## 7. Conclusões

Este estudo efetuado ao longo de 2 anos em doentes diabéticos sem RD (ETDRS nível 10) e com RDNP ligeira (ETDRS nível 20-35), utilizando ERGmf e SD-OCT para avaliar a presença de neurodegeneração retiniana, permitiu obter as seguintes conclusões:

1. Confirma-se a presença de alterações neurodegenerativas sem haver lesões de microangiopatia detetada com os métodos usados. Doentes diabéticos sem RD e com RDNP, quando comparados com indivíduos não diabéticos, apresentam maior tempo de latência e menor amplitude da onda P1 ( $p < 0.001$ ). Apresentam, ainda, uma menor espessura dos segmentos externos dos fotorreceptores ( $p < 0.001$ ) e da camada de células ganglionares/camada plexiforme interna ( $p < 0.001$ ), sugerindo a presença de alterações neurodegenerativas nas fases iniciais da doença, mesmo antes do aparecimento de lesões microvasculares visíveis na fundoscopia. Observou-se, também, uma espessura significativamente maior da camada nuclear interna ( $p < 0.001$ ) e da camada plexiforme externa ( $p = 0.002$ ) nos doentes diabéticos comparativamente ao grupo controlo. Estes achados sugerem que o comprometimento neurovascular é possivelmente secundário a alteração da BHR e resultante acumulação de fluido extracelular nas camadas da retina, de que resulta perda de células ganglionares e bipolares.

2. Verificou-se que, apesar da redução da espessura das CCG/CPI existente nos doentes diabéticos, esta camada é mais espessa no grupo com maior gravidade de RD (RDNP ligeira), apesar da resposta funcional destes doentes estar mais alterada que no grupo de doentes diabéticos sem RD. Este achado sugere que a degeneração neuronal, e consequente diminuição da espessura da retina, pode efetivamente ser mascarada pela acumulação de fluido associado à rutura da BHR, resultando na aquisição de diferentes valores de espessura da retina em indivíduos diferentes, nas fases iniciais da RD.

3. Usando o SD-OCT e o ERGmf, e um grupo de indivíduos saudáveis sem DM como grupo controlo, foi possível observar que a DM tem um efeito neurodegenerativo precoce nas diferentes camadas da retina, que está presente sem que o componente vascular da RD se tenha manifestado ou permaneça mínimo, podendo ocorrer em graus variáveis, em indivíduos diferentes.

4. Ao nível do controlo metabólico da doença, este estudo revelou que os valores de HbA1c se correlacionam maioritariamente com alterações das camadas mais externas

da retina (EPR e CNE/SIF), enquanto a duração da DM se correlaciona com a espessura das camadas mais internas da retina (CCG/CPI e CNI).

5. A tendência para maior alteração da função retiniana nos doentes diabéticos com maior gravidade de RD enfatiza a necessidade de novas abordagens terapêuticas que atuem em fases mais precoces da doença, minimizando dessa forma a perda significativa da função visual ao longo da progressão da doença sistémica.

6. O ERGmf e o SD-OCT são métodos não-invasivos que permitem avaliar a unidade neurovascular da retina e identificar alterações funcionais e estruturais precoces no decurso da evolução da RD. Estas alterações são detetadas antes da observação fundoscópica de lesões microvasculares, auxiliando o acompanhamento clínico dos doentes diabéticos.

7. Os mecanismos fisiopatológicos da RD perspetivam a continuidade deste estudo, pois dois anos não são suficientes para detetar alterações. Por outro lado, deverão ser incluídas outras variáveis que permitam explicar as alterações que observamos nas camadas da retina.

## 8. Perspetivas Futuras

Considera-se que estudos longitudinais prospetivos futuros serão necessários para confirmar e complementar estes resultados, sendo este um projeto promissor de uma investigação de continuidade.

O acompanhamento destes doentes diabéticos por um intervalo de tempo maior, ajudar-nos-á a perceber melhor as alterações que, apesar de apenas dois anos de seguimento, já foram identificadas através da ERGmf e da segmentação da espessura das diferentes camadas da retina.

Seria importante avaliar áreas de não perfusão retiniana e alterações progressivas da zona avascular foveal através de outras tecnologias não-invasivas, atualmente disponíveis, de forma a poder correlacionar com os achados funcionais e estruturais encontrados neste estudo.

Uma amostra maior dos subgrupos de doentes diabéticos seria mais promissora e poderia fundamentar melhor os achados por nós encontrados.



## 9. Referências

1. Swaroop A, Kim D, Forrest D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nature reviews Neuroscience*. 2010;11(8):563-76.
2. Ting DS, Cheung GC, Wong TY. Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2016;44(4):260-77.
3. Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *The Lancet Global health*. 2013;1(6):e339-49.
4. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care*. 2012;35(3):556-64.
5. Simo R, Hernandez C, European Consortium for the Early Treatment of Diabetic R. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2014;25(1):23-33.
6. Hernandez C, Simo R. Neuroprotection in diabetic retinopathy. *Current diabetes reports*. 2012;12(4):329-37.
7. Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2003;27(2):283-90.
8. Plum L, Schubert M, Bruning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005;16(2):59-65.
9. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25.
10. Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(2):1156-63.

11. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Mann GE, Zhang JJ, Kohner EM. Protein kinase C beta2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leukocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2003;52(6):1519-27.
12. Norma nº 002/2011 de 14/01/2011 - Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0022011-de-14012011.aspx> [05-06-2017].
13. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1998;15(7):539-53.
14. Atlas ID. International Diabetes Federation [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org): International Diabetes Federation 2015 978-2-930229-81-2 Contract No.: 05-06-2017.
15. World Health Organization - Prevention of Blindness from Diabetes Mellitus Geneva2006 [Abril 2017]. Available from: [http://www.who.int/diabetes/publications/prevention\\_diabetes2006/en/](http://www.who.int/diabetes/publications/prevention_diabetes2006/en/).
16. Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, Mesquita AC, Fona C, Carvalho R, et al. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2010;27(8):879-81.
17. Diabetes: Factos e Números 2015 - Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes 2016 [04-05-2017]. Available from: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2017/03/15/diabetes-factos-e-numeros-2015/>.
18. Guyton A, Hall J. *Textbook Of Medical Physiology*. 13th ed. Philadelphia2016.
19. Sociedade Portuguesa de Diabetologia - Definição, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus [4-5-2017]. Available from: [www.spd.pt/index.php/grupos-de-estudo-mainmenu-30/classificacao-da-diabetes-mellitus-mainmenu-175](http://www.spd.pt/index.php/grupos-de-estudo-mainmenu-30/classificacao-da-diabetes-mellitus-mainmenu-175).
20. World Health Organization - Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia Geneva2006 [Abril 2017]. Available from: [http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis\\_diabetes2006/en/](http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/).

21. Campos C. Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae. *Postgraduate medicine*. 2012;124(6):90-7.
22. Scanlon PH, Aldington SJ, Stratton IM. Epidemiological issues in diabetic retinopathy. *Middle East African journal of ophthalmology*. 2013;20(4):293-300.
23. Raman R, Gella L, Srinivasan S, Sharma T. Diabetic retinopathy: An epidemic at home and around the world. *Indian journal of ophthalmology*. 2016;64(1):69-75.
24. Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye Vis (Lond)*. 2015;2:17.
25. Tavares Ferreira J, Alves M, Dias-Santos A, Costa L, Santos BO, Cunha JP, et al. Retinal Neurodegeneration in Diabetic Patients Without Diabetic Retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(14):6455-60.
26. Dutra Medeiros M, Mesquita E, Gardete-Correia L, Moita J, Genro V, Papoila AL, et al. First Incidence and Progression Study for Diabetic Retinopathy in Portugal, the RETINODIAB Study: Evaluation of the Screening Program for Lisbon Region. *Ophthalmology*. 2015;122(12):2473-81.
27. Cunha-Vaz J, Ribeiro L, Lobo C. Phenotypes and biomarkers of diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*. 2014;41:90-111.
28. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine*. 2012;366(13):1227-39.
29. Stem MS, Gardner TW. Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Current medicinal chemistry*. 2013;20(26):3241-50.
30. Jonsson KB, Frydkjaer-Olsen U, Grauslund J. Vascular Changes and Neurodegeneration in the Early Stages of Diabetic Retinopathy: Which Comes First? *Ophthalmic research*. 2016;56(1):1-9.
31. Hernandez C, Dal Monte M, Simo R, Casini G. Neuroprotection as a Therapeutic Target for Diabetic Retinopathy. *Journal of diabetes research*. 2016;2016:9508541.

32. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. 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*. 1998;105(10):1801-15.
33. Wong TY, Liew G, Tapp RJ, Schmidt MI, Wang JJ, Mitchell P, et al. Relation between fasting glucose and retinopathy for diagnosis of diabetes: three population-based cross-sectional studies. *Lancet*. 2008;371(9614):736-43.
34. Writing Team for the Diabetes C, Complications Trial/Epidemiology of Diabetes I, Complications Research G. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *Jama*. 2002;287(19):2563-9.
35. Kohner EM, Stratton IM, Aldington SJ, Holman RR, Matthews DR, Group UKPDS. Relationship between the severity of retinopathy and progression to photocoagulation in patients with Type 2 diabetes mellitus in the UKPDS (UKPDS 52). *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2001;18(3):178-84.
36. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *American journal of ophthalmology*. 2000;129(5):704-5.
37. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology*. 1994;112(9):1217-28.
38. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. X. Four-year incidence and progression of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 years or more. *Archives of ophthalmology*. 1989;107(2):244-9.
39. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. IX. Four-year incidence and progression of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Archives of ophthalmology*. 1989;107(2):237-43.
40. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. 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. 1984;102(4):520-6.

41. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. 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. 1984;102(4):527-32.

42. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. Bmj. 1998;317(7160):703-13.

43. Lobo CL, Bernardes RC, Figueira JP, de Abreu JR, Cunha-Vaz JG. 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. 2004;122(2):211-7.

44. Cho H, Sobrin L. Genetics of diabetic retinopathy. Current diabetes reports. 2014;14(8):515.

45. Omar AF, Silva PS, Sun JK. Genetics of diabetic retinopathy. Seminars in ophthalmology. 2013;28(5-6):337-46.

46. 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. 1991;98(5 Suppl):786-806.

47. American Academy of Ophthalmology - Preferred Practice Pattern Guidelines Diabetic Retinopathy [Internet]. 2016 [cited junho 2017]. Available from: [www.aao.org/ppp](http://www.aao.org/ppp).

48. Cunha-Vaz JG. Retinopatia Diabética. Coimbra: Edição da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia; 1992.

49. Wilkinson CP, Ferris FL, 3rd, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. Ophthalmology. 2003;110(9):1677-82.

50. Cunha-Vaz JG. Diabetic retinopathy. Human and experimental studies. Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom. 1972;92:111-24.
51. Lorenzi M, Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. Diabetologia. 2001;44(7):791-804.
52. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. European journal of ophthalmology. 2011;21 Suppl 6:S3-9.
53. Boeri D, Maiello M, Lorenzi M. Increased prevalence of microthromboses in retinal capillaries of diabetic individuals. Diabetes. 2001;50(6):1432-9.
54. Jousseaume AM, Lemmen KD, Kirchhof B. [Diabetic maculopathy. Etiological mechanisms and possible treatment approaches]. Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft. 2001;98(9):908-18; quiz 19, 21.
55. Emanuele N, Klein R, Moritz T, Davis MD, Glander K, Anderson R, et al. Comparison of dilated fundus examinations with seven-field stereo fundus photographs in the Veterans Affairs Diabetes Trial. Journal of diabetes and its complications. 2009;23(5):323-9.
56. Photocoagulation for diabetic macular edema: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report no. 4. The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. International ophthalmology clinics. 1987;27(4):265-72.
57. Cunha-Vaz J. The blood-ocular barriers. Survey of ophthalmology. 1979;23(5):279-96.
58. Cunha-Vaz J, Faria de Abreu JR, Campos AJ. Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. The British journal of ophthalmology. 1975;59(11):649-56.
59. Bronson-Castain KW, Barse MA, Jr., Neuvillie J, Jonasdottir S, King-Hooper B, Barez S, et al. Adolescents with Type 2 diabetes: early indications of focal retinal neuropathy, retinal thinning, and venular dilation. Retina. 2009;29(5):618-26.
60. Barse MA, Jr., Adams AJ, Han Y, Schneck ME, Ng J, Bronson-Castain K, et al. A multifocal electroretinogram model predicting the development of diabetic retinopathy. Progress in retinal and eye research. 2006;25(5):425-48.

61. Jindal V. Neurodegeneration as a primary change and role of neuroprotection in diabetic retinopathy. *Molecular neurobiology*. 2015;51(3):878-84.
62. Ola MS, Nawaz MI, Khan HA, Alhomida AS. Neurodegeneration and neuroprotection in diabetic retinopathy. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(2):2559-72.
63. Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, LaNoue KF, Levison SW. Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Survey of ophthalmology*. 2002;47 Suppl 2:S253-62.
64. Fletcher EL, Phipps JA, Ward MM, Puthussery T, Wilkinson-Berka JL. Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy. *Current pharmaceutical design*. 2007;13(26):2699-712.
65. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*. 2006;25(4):397-424.
66. Gowda K, Zinnanti WJ, LaNoue KF. The influence of diabetes on glutamate metabolism in retinas. *Journal of neurochemistry*. 2011;117(2):309-20.
67. Cai J, Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye*. 2002;16(3):242-60.
68. Stitt AW, Curtis TM, Chen M, Medina RJ, McKay GJ, Jenkins A, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*. 2016;51:156-86.
69. Lechner J, O'Leary OE, Stitt AW. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision research*. 2017.
70. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(6779):787-90.
71. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(1):23-30.

72. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Experimental diabetes research*. 2007;2007:61038.
73. Sharma Y, Saxena S, Mishra A, Saxena A, Natsu SM. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *Journal of ocular biology, diseases, and informatics*. 2012;5(3-4):63-9.
74. A Lecleire-Collet, L H Tessier, P Massin, V Forster, G Brasseur, J A Sahel, et al. Advanced glycation end products can induce glial reaction and neuronal degeneration in retinal explants. *The British journal of ophthalmology*. 2005  
89(12):1631-3.
75. Zhang X, Wang N, Barile GR, Bao S, Gillies M. Diabetic retinopathy: neuron protection as a therapeutic target. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(7):1525-9.
76. Gerald P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation research*. 2010;106(8):1319-31.
77. Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2008;9(4):315-27.
78. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;40(4):405-12.
79. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(7):1049-57.
80. Mohammad G, Siddiquei MM, Abu El-Asrar AM. Poly (ADP-ribose) polymerase mediates diabetes-induced retinal neuropathy. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:510451.
81. Noda K, Nakao S, Ishida S, Ishibashi T. Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. *Journal of ophthalmology*. 2012;2012:279037.

82. Schroder S, Palinski W, Schmid-Schonbein GW. Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy. *The American journal of pathology*. 1991;139(1):81-100.
83. Caicedo A, Espinosa-Heidmann DG, Pina Y, Hernandez EP, Cousins SW. Blood-derived macrophages infiltrate the retina and activate Muller glial cells under experimental choroidal neovascularization. *Experimental eye research*. 2005;81(1):38-47.
84. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1111-9.
85. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*. 2005;438(7070):960-6.
86. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*. 2011;30(5):343-58.
87. Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Seminars in immunopathology*. 2008;30(2):65-84.
88. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*. 2006;55(9):2401-11.
89. Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW. Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(11):3561-8.
90. Wolff BE, Bearnse MA, Jr., Schneck ME, Dhamdhare K, Harrison WW, Barez S, et al. Color vision and neuroretinal function in diabetes. *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology*. 2015;130(2):131-9.
91. Dhamdhare KP, Bearnse MA, Jr., Harrison W, Barez S, Schneck ME, Adams AJ. Associations between local retinal thickness and function in early diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(10):6122-8.
92. Bronson-Castain KW, Bearnse MA, Jr., Neuville J, Jonasdottir S, King-Hooper B, Barez S, et al. Early neural and vascular changes in the adolescent type 1 and type 2 diabetic retina. *Retina*. 2012;32(1):92-102.

93. Bronson-Castain KW, Bearse MA, Jr., Han Y, Schneck ME, Barez S, Adams AJ. Association between multifocal ERG implicit time delays and adaptation in patients with diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(11):5250-6.
94. Han Y, Bearse MA, Jr., Schneck ME, Barez S, Jacobsen CH, Adams AJ. Multifocal electroretinogram delays predict sites of subsequent diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(3):948-54.
95. Han Y, Adams AJ, Bearse MA, Jr., Schneck ME. Multifocal electroretinogram and short-wavelength automated perimetry measures in diabetic eyes with little or no retinopathy. *Archives of ophthalmology*. 2004;122(12):1809-15.
96. Sutter EE, Tran D. The field topography of ERG components in man--I. The photopic luminance response. *Vision research*. 1992;32(3):433-46.
97. Sutter EE. Imaging visual function with the multifocal m-sequence technique. *Vision research*. 2001;41(10-11):1241-55.
98. Sutter E. The interpretation of multifocal binary kernels. *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology*. 2000;100(2-3):49-75.
99. Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS, et al. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology*. 2012;124(1):1-13.
100. Laron M, Bearse MA, Jr., Bronson-Castain K, Jonasdottir S, King-Hooper B, Barez S, et al. Interocular symmetry of abnormal multifocal electroretinograms in adolescents with diabetes and no retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(1):316-21.
101. Adams AJ, Bearse MA, Jr. Retinal neuropathy precedes vasculopathy in diabetes: a function-based opportunity for early treatment intervention? *Clinical & experimental optometry*. 2012;95(3):256-65.
102. Harrison WW, Bearse MA, Jr., Schneck ME, Wolff BE, Jewell NP, Barez S, et al. Prediction, by retinal location, of the onset of diabetic edema in patients with nonproliferative diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(9):6825-31.

103. Ng JS, Bearnse MA, Jr., Schneck ME, Barez S, Adams AJ. Local diabetic retinopathy prediction by multifocal ERG delays over 3 years. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(4):1622-8.
104. Fortune B, Schneck ME, Adams AJ. Multifocal electroretinogram delays reveal local retinal dysfunction in early diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1999;40(11):2638-51.
105. Bearnse MA, Jr., Han Y, Schneck ME, Barez S, Jacobsen C, Adams AJ. Local multifocal oscillatory potential abnormalities in diabetes and early diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(9):3259-65.
106. Reis A, Mateus C, Melo P, Figueira J, Cunha-Vaz J, Castelo-Branco M. Neuroretinal dysfunction with intact blood-retinal barrier and absent vasculopathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(11):3926-37.
107. Tan W, Wright T, Dupuis A, Lakhani E, Westall C. Localizing functional damage in the neural retina of adolescents and young adults with type 1 diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(4):2432-41.
108. Hood DC. Assessing retinal function with the multifocal technique. *Progress in retinal and eye research*. 2000;19(5):607-46.
109. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991;254(5035):1178-81.
110. Calabresi PA, Balcer LJ, Frohman EM. *Optical Coherence Tomography in Neurologic Diseases*: Cambridge University Press; 2015.
111. van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PH, Stehouwer M, Garvin MK, Sonka M, et al. Early neurodegeneration in the retina of type 2 diabetic patients. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(6):2715-9.
112. Li K, Wu X, Chen DZ, Sonka M. Optimal surface segmentation in volumetric images--a graph-theoretic approach. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*. 2006;28(1):119-34.

113. Bandello F, Tejerina AN, Vujosevic S, Varano M, Egan C, Sivaprasad S, et al. Retinal layer location of increased retinal thickness in eyes with subclinical and clinical macular edema in diabetes type 2. *Ophthalmic research*. 2015;54(3):112-7.
114. Li ST, Wang XN, Du XH, Wu Q. Comparison of spectral-domain optical coherence tomography for intra-retinal layers thickness measurements between healthy and diabetic eyes among Chinese adults. *PLoS one*. 2017;12(5):e0177515.
115. Kern TS, Berkowitz BA. Photoreceptors in diabetic retinopathy. *Journal of diabetes investigation*. 2015;6(4):371-80.
116. Reiter CE, Wu X, Sandirasegarane L, Nakamura M, Gilbert KA, Singh RS, et al. Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin. *Diabetes*. 2006;55(4):1148-56.
117. Oshitari T, Hanawa K, Adachi-Usami E. Changes of macular and RNFL thicknesses measured by Stratus OCT in patients with early stage diabetes. *Eye*. 2009;23(4):884-9.
118. Fernandez DC, Somfai GM, Tátrai E, Ranganathan S, Yee DC, Ferencz M, et al. Potentiality of Intraretinal Layer Segmentation to Locally Detect Early Retinal Changes in Patients With Diabetes Mellitus Using Optical Coherence Tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49.
119. Cabrera DeBuc D, Somfai GM. Early detection of retinal thickness changes in diabetes using Optical Coherence Tomography. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2010;16(3):MT15-21.
120. Vujosevic S, Midena E. Retinal layers changes in human preclinical and early clinical diabetic retinopathy support early retinal neuronal and Muller cells alterations. *Journal of diabetes research*. 2013;2013:905058.
121. Rodrigues EB, Urias MG, Penha FM, Badaro E, Novais E, Meirelles R, et al. Diabetes induces changes in neuroretina before retinal vessels: a spectral-domain optical coherence tomography study. *International journal of retina and vitreous*. 2015;1:4.
122. Pires I, Santos AR, Nunes S, Lobo C. 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*



international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde. 2013;229(4):181-6.

123. Hood DC, Frishman LJ, Saszik S, Viswanathan S. Retinal origins of the primate multifocal ERG: implications for the human response. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(5):1673-85.

124. Carrasco E, Hernandez C, de Torres I, Farres J, Simo R. Lowered cortistatin expression is an early event in the human diabetic retina and is associated with apoptosis and glial activation. *Molecular vision*. 2008;14:1496-502.

125. Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, Muniz A, Mendiola AS, Tsin AT, et al. The role of microglia in diabetic retinopathy. *Journal of ophthalmology*. 2014;2014:705783.

126. Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, Kok PH, Jeong W, Demirkaya N, et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(19):E2655-64.

127. Demirkaya N, van Dijk HW, van Schuppen SM, Abramoff MD, Garvin MK, Sonka M, et al. Effect of age on individual retinal layer thickness in normal eyes as measured with spectral-domain optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(7):4934-40.

128. Masland RH. The neuronal organization of the retina. *Neuron*. 2012;76(2):266-80.

129. Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nature neuroscience*. 2001;4(9):877-86.



## 10. Anexo

Fruto deste trabalho resultou até ao momento uma publicação em que sou primeira autora.

### **Development of a Normative Database for Multifocal Electroretinography in the Context of a Multicenter Clinical Trial.**

Simão S, Costa MÂ, Sun JK, Cunha-Vaz J, Simó R; European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR).

Ophthalmic Res. 2017;57(2):107-117

DOI: 10.1159/000450958



# Development of a Normative Database for Multifocal Electroretinography in the Context of a Multicenter Clinical Trial

Sílvia Simão<sup>a</sup> Miguel Ângelo Costa<sup>a</sup> Jennifer K. Sun<sup>b</sup> José Cunha-Vaz<sup>a</sup>  
Rafael Simó<sup>c</sup> on behalf of the European Consortium for the Early Treatment of  
Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR)

<sup>a</sup>Association for Innovation and Biomedical Research on Light and Image (AIBILI), Coimbra, Portugal; <sup>b</sup>Beetham Eye Institute, Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA; <sup>c</sup>Vall d'Hebron Research Institute (VHIR) and CIBERDEM (Instituto de Salud Carlos III), Barcelona, Spain

## Keywords

Multifocal electroretinography · Retina · Normative database · Retinal function

## Abstract

**Purpose:** The aim of this study is to present the largest normative database using multifocal electroretinography (mfERG) in the context of a multicenter clinical trial. **Methods:** This investigational study included 156 eyes from 78 Caucasian subjects aged 45–70 years without known ophthalmic disease or diabetes mellitus; the subjects were recruited from 11 clinical sites in the setting of the EUROCONDOR project. Standardized mfERG acquisition (103 hexagons per eye) was established based on the International Society of Clinical Electrophysiology in Vision. At least one technician per site received both specialized training and certification. The main variables that could have influenced the results were considered in the analyses. **Results:** The normative database was based on 111 eyes. The overall mean

P1-implicit time (IT) was  $33.94 \pm 1.70$  ms, and the mean P1 amplitude was  $30.58 \pm 5.20$  nV/deg<sup>2</sup>. Age and gender were independently related to predictors of P1-IT but not of P1 amplitude. The responses that were averaged for the 6 rings showed a longer P1-IT time in the fovea, decreasing progressively to the parafovea and perifovea. By contrast, P1 amplitude values sharply decreased with retinal eccentricity. **Conclusions:** This normative database can be used as a comparative index of expected normal values in the clinical setting and for examining the effect of studies testing neuroprotective agents.

© 2017 S. Karger AG, Basel

## Introduction

The multifocal electroretinography (mfERG) technique was developed by Sutter and Tran [1] as a noninvasive method of recording the spatial distribution of focal ERG using multiple input stimulation. At present it is

Members of the EUROCONDOR Consortium who contributed to this study are listed in Acknowledgments.

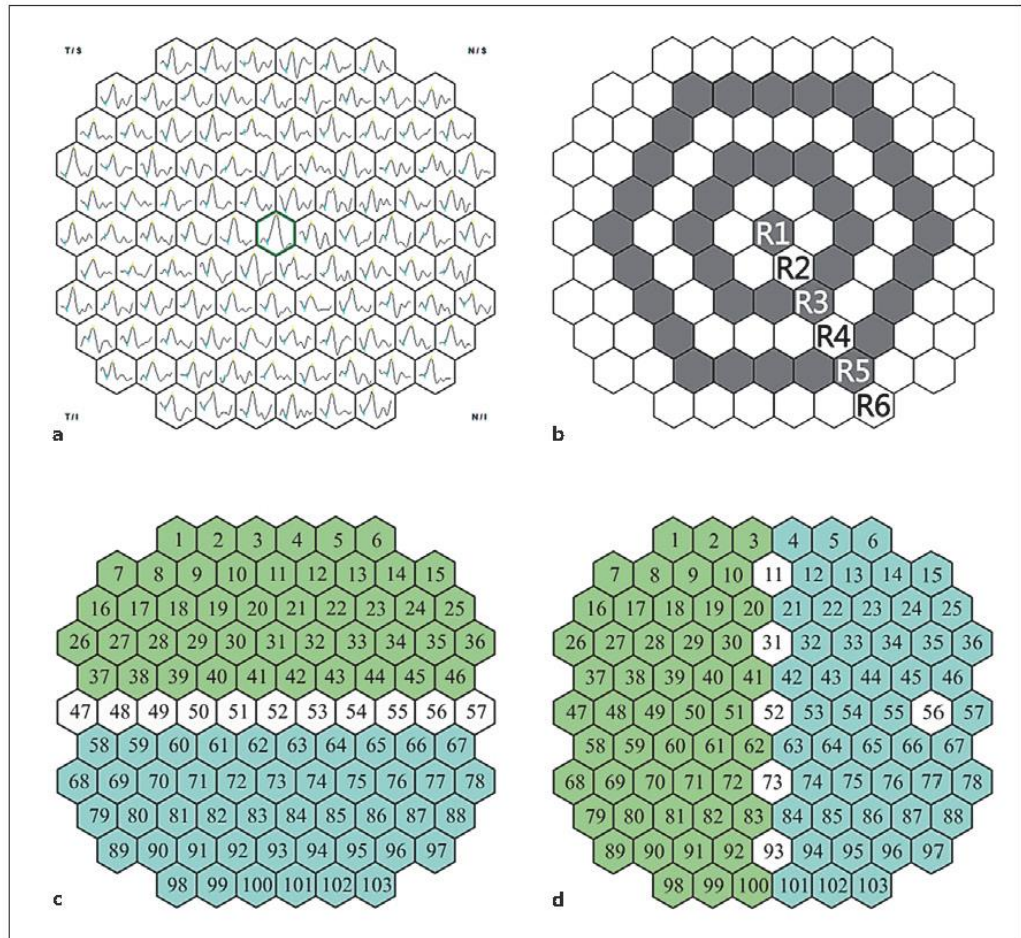
Sílvia Simão  
AIBILI, Azinhaga de Santa Comba  
Celas  
PT-3000-548 Coimbra (Portugal)  
E-Mail silvia@ai bili.pt

Rafael Simó  
Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron  
Pg. Vall d'Hebron 119-129  
ES-08035 Barcelona (Spain)  
E-Mail rafael.simo@vhir.org

KARGER

© 2017 S. Karger AG, Basel  
0030-3747/17/0000-0000\$39.50/0

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



**Fig. 2.** mfERG examination hexagons. **a** Representation of trace array of P1 amplitude from a normal left eye. **b** Representation of 6 concentric rings (R1–R6). **c** Upper retinal hemifield (green hexagons) and lower retinal hemifield (blue hexagons) representation. **d** Nasal retinal hemifield (green hexagons) and temporal retinal hemifield (blue hexagons) representation. The white hexagons of **c** and **d** were excluded from the analysis to prevent the contribution of these areas that are irrelevant to the concept of asymmetry.

technician from all 11 sites received specialized training at Coimbra Ophthalmology Reading Centre (CORC) to standardize the acquisition protocol and to ensure consistency of the examination technique. In addition, all sites received individualized on-site refresher training following specialized training and were certified by CORC. Before participating in EURCONDOR, each technician performed an mfERG examination on 4 eyes according to the acquisition protocol to obtain their certification. Certification acquisitions were reviewed by CORC to ensure high quality examinations.

#### Analysis of Responses

The quality assessment of the examinations was based on the evaluation of fixation, trace array waveform, and noise. Analyses were performed using the first-order kernels. The amplitude (nV/

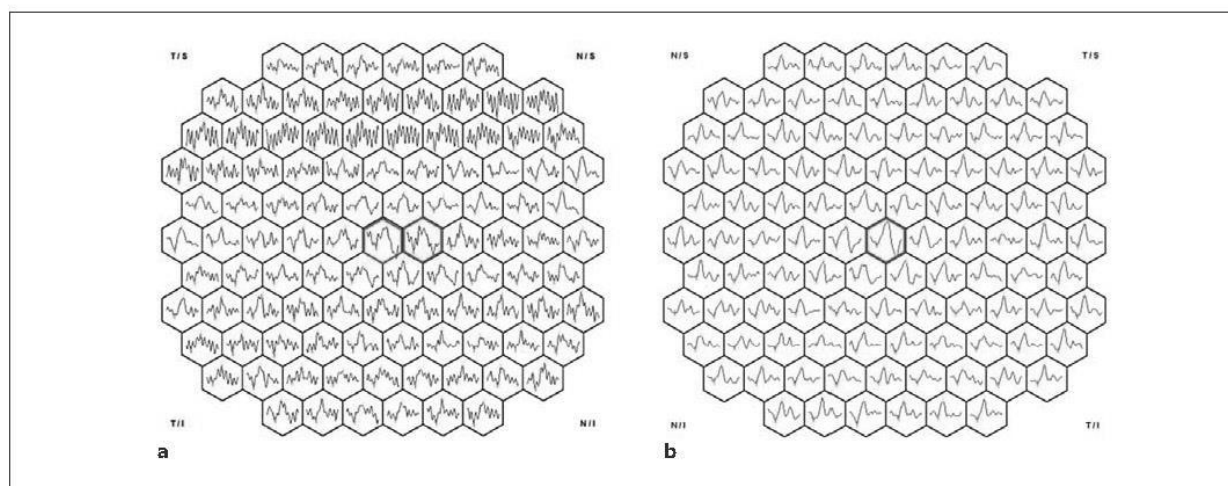
deg<sup>2</sup>) and implicit time (IT; ms) of the P1 were calculated for each hexagon (Fig. 2a), and the following measurements were performed: 6 concentric rings (Fig. 2b), upper and lower retinal hemifields (Fig. 2c), nasal and temporal retinal hemifields (Fig. 2d), and the 35 zones described by Han et al. [6] (Fig. 3).

#### Statistics

Descriptive statistics were calculated for the amplitude and IT of each hexagon, ring, hemisphere, and retinal zone. The correlations between IT and amplitude and age were analyzed with the Spearman correlation coefficient. The means of the retinal hemispheres were compared with paired-samples *t* tests. To account for differences in age and gender, multivariate regression models were also employed with interactions between age and gender; as a rule, nonsignificant interaction terms were removed from the models.

**Table 2.** Mean P1-IT and amplitude of the 6 concentric rings

	Ring 1	Ring 2	Ring 3	Ring 4	Ring 5	Ring 6
P1-IT, ms	41.96±3.46	35.95±2.00	34.21±1.80	33.53±1.82	33.45±1.69	33.83±1.77
P1 amplitude, nV/deg <sup>2</sup>	128.93±26.42	70.15±13.34	46.83±8.27	32.56±5.72	25.02±4.73	20.27±4.04



**Fig. 5.** Representation of mfERG trace arrays. **a** Representation of trace array from a normal left eye with eccentric fixation (red hexagon), too much noise, and no typical plots. **b** Representation of trace array from a normal right eye with good fixation (green hexagon), acceptable noise, and typical plots.

sion analysis was performed to investigate the influence of gender and age on P1-IT. This analysis showed that both age ( $p = 0.003$ ) and gender ( $p = 0.006$ ) were significantly and independently associated with P1-IT. By contrast, the amplitude did not vary by gender (females: mean P1 30.56 ± 4.95; males: mean P1 30.66 ± 1.13,  $p = 0.931$ ).

#### Analysis of the Results Taking Retinal Rings into Account

The responses of P1-IT (ms) and amplitude (nV/deg<sup>2</sup>) of all hexagons were averaged and are summarized by ring from the center to the periphery, as shown in Table 2. The IT was longer in the central ring, decreased in the parafovea, and only slightly increased again in the periphery (ring 6). The amplitude progressively decreased with the eccentricity of the retina. The results of the multiple ring comparisons with multilevel mixed-effects linear regressions adjusted for age and gender are presented in Tables 3 and 4, showing that the decrease in P1-IT and

**Table 3.** Differences in mean P1-IT between rings by multilevel mixed-effects linear regression adjusted for age and gender

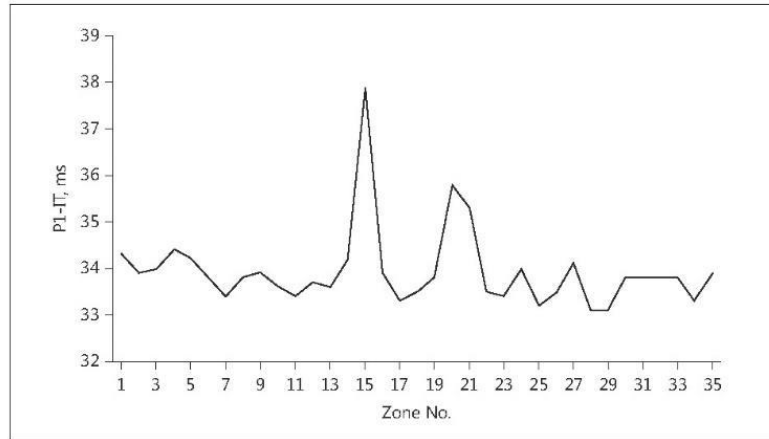
Rings	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6
R 1						
R 2	-6.016*					
R 3	-7.755*	-1.739*				
R 4	-8.440*	-2.424*	-0.685*			
R 5	-8.523*	-2.506*	-0.768*	-0.082		
R 6	-8.141*	-2.124*	-0.386*	0.300*	0.382*	

\* Significant for  $p < 0.003$  (Bonferroni adjustment for 15 comparisons).

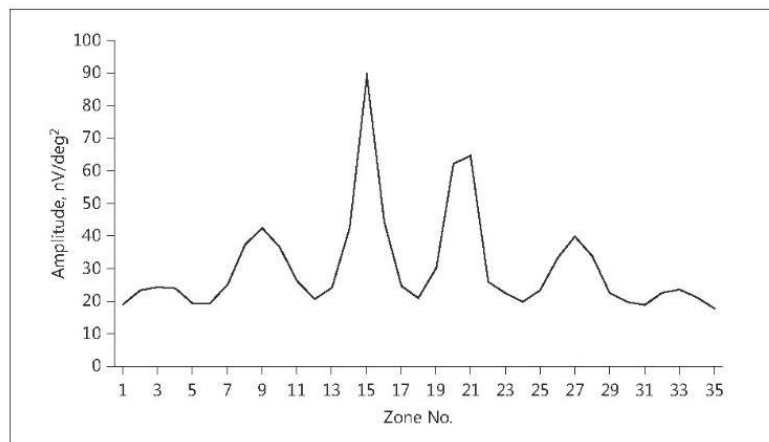
amplitude is significant except in rings 4 and 5, which have similar P1-IT. The P1-IT and amplitude values were averaged and analyzed by age group and rings, as shown in Tables 5 and 6, respectively. Similarly to previous analyses, the effect of gender on age was evaluated by multi-

**Table 7.** Mean P1-IT and amplitude of the upper, lower, nasal, and temporal retinal hemifields

	Upper retinal hemifield	Lower retinal hemifield	<i>p</i> value	Nasal retinal hemifield	Temporal retinal hemifield	<i>p</i> value
P1-IT, ms	33.88±1.76	33.71±1.66	0.002	33.95±1.72	33.75±1.70	<0.001
P1 amplitude, nV/deg <sup>2</sup>	29.50±5.44	27.79±5.03	<0.001	29.20±5.25	29.35±5.13	0.463



**Fig. 6.** Distribution of mean P1-IT by zone (*n* = 35 zones).



**Fig. 7.** Distribution of mean P1 amplitude by zone (*n* = 35 zones).

upper (difference = 0.17 ms, *p* = 0.002) and nasal retina (difference = 0.20 ms, *p* < 0.001) (Table 7). P1 amplitude was found to be significantly higher in the upper retina (difference = 1.71 nV/deg<sup>2</sup>, *p* < 0.001), while the nasal and temporal hemifields presented no significant differences (Table 7).

In order to control the confounding of age and gender in the hemifield analysis, multilevel mixed-effects linear regressions were employed, confirming that the differences in P1-IT and amplitude between hemifields are independent of age or gender (*p* < 0.03 for all independent variables).



- 13 Kashani AH, Zimmer-Galler IE, Shah SM, Dustin L, Do DV, Elliott D, et al: Retinal thickness analysis by race, gender, and age using Straus OCT. *Am J Ophthalmol* 2010;149:496–502.
- 14 Grover S, Murthy RK, Brar VS, Chalam KV: Normative data for macular thickness by high-definition spectral-domain optical coherence tomography (Spectralis). *Am J Ophthalmol* 2009;148:266–271.
- 15 Sull AC, Vuong LN, Price LL, Srinivasan VJ, Gorczynska I, Fujimoto JG, et al: Comparison of spectral/Fourier domain optical coherence tomography instruments for assessment of normal macular thickness. *Retina* 2010;30:235–245.
- 16 Coupland SG, Wu D: International Multi-center Normative ERG Database Using the ISCEV Standard. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1669.
- 17 Asefzadeh B, Cavallerano AA, Fisch BM: Racial differences in macular thickness in healthy eyes. *Optom Vis Sci* 2007;84:941–945.
- 18 Kelty PJ, Payne JF, Trivedi RH, Kelty J, Bowie EM, Burger BM: Macular thickness assessment in healthy eyes based on ethnicity using Straus OCT optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;48:2668–2672.
- 19 Wagner-Schuman M, Dubis AM, Nordgren RN, Lei Y, Odell D, Chiao H, et al: Race- and sex-related differences in retinal thickness and foveal pit morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:625–634.
- 20 Curcio CA, Slan KR Jr, Packer O, Hendrickson AE, Kalina RE: Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry. *Science* 1987;236:579–582.
- 21 Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE: Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol* 1990;292:497–523.
- 22 Hood DC, Seiple W, Holopigian K, Greenstein VC: A comparison of the components of the multifocal and full-field ERGs. *Vis Neurosci* 1997;14:533–544.
- 23 Fortune B, Schneck ME, Admas AJ: Multifocal electroretinogram delays reveal local retinal dysfunction in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2638–2650.
- 24 Bearse MA Jr, Adams AJ, Han Y, Schneck ME, Ng JS, Bronson-Castain K, et al: A multifocal electroretinogram model predicting the development of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 2006;25:425–448.
- 25 Ng JS, Bearse MA Jr, Schneck ME, Barez S, Adams AJ: Local diabetic retinopathy prediction by multifocal ERG delays over 3 years. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1622–1628.
- 26 Bearse MA Jr, Ozawa GY: Multifocal electroretinography in diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Curr Diab Rep* 2014;14:526.
- 27 Holm K, Adrien M: In diabetic eyes, multifocal ERG reflects differences in function between the nasal part and the temporal part of the macula. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;50:1143–1148.