

Espessura da Coróide na Doença de Alzheimer Versus Envelhecimento

João Paulo Cunha^{1,2}; Rita Pinto Proença^{1*}
Diana Melancia¹; Guilherme Neri Pires¹; Arnaldo Dias-Santos^{1,2}; Joana Ferreira^{1,2}; Marta Alves²; Ana Luísa Papoila²; António Castanheira Dinis³
¹Centro Hospitalar de Lisboa Central
²Nova Medical School
³Centro de Estudos das Ciências da Visão
^{*} 1^os autores

RESUMO

Introdução: Os fatores vasculares desempenham um papel importante na patogénese da doença de Alzheimer (DA). O estreitamento dos vasos da retina está amplamente descrito na literatura mas, no entanto, as alterações da coróide nesta doença estão ainda pouco descritas e ainda menos compreendidas. Os autores têm como objetivo medir a espessura da coróide em 13 localizações diferentes, centrifugas à fóvea, com recurso ao EDI-OCT (Enhanced Depth Imaging - Optical Coherence Tomography), e comparar a espessura da coróide em doentes com DA com a de indivíduos normais mais idosos.

Métodos: Estudo observacional transversal que incluiu cinquenta olhos de 50 doentes com diagnóstico de DA, com uma idade média de 73 anos (DP±5,36) e 50 olhos de 50 indivíduos controlo mais idosos, com média de idade de 82,14 anos (DP±3,67). Todos os indivíduos foram submetidos a avaliação neuropsicológica e oftalmológica.

As imagens da coróide foram obtidas por EDI-OCT. A espessura da coróide foi medida de forma manual, subfovealmente, e em intervalos de 500 µm até 1,5 mm temporal, nasal, superior e inferior à fóvea. A análise estatística foi realizada para avaliar variações de espessura da coróide em cada localização.

Resultados: Observou-se uma tendência generalizada para a diminuição da espessura da coróide nos doentes com DA face ao grupo controlo (137,60 a 179,50µm versus 156,34 a 190,44µm, respetivamente). Esta tendência teve significância estatística em 3 localizações: subfoveal, 500 e 1000 µm temporais à fóvea (p <0,05).

Conclusão: Os doentes com DA mostraram uma redução estatisticamente significativa da espessura da coróide em 3 das localizações estudadas. Este adelgaçamento coróideu pode refletir a importância do factor vascular na patogénese desta doença, e representar uma coroidopatia relacionada com a doença de Alzheimer distinta da coroidopatia do envelhecimento.

Palavras-chave: doença de Alzheimer, envelhecimento, espessura da coróide, EDI- OCT (enhanced depth imaging - optical coherence tomography).

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência e representa um importante problema de saúde pública mundial com grande impacto social e espessura da coróide.¹ Tem havido grande interesse em determinar como os mecanismos vasculares contribuem para o desenvolvimento da DA.^{2,3} A primeira alteração histopatológica no cérebro de doentes com DA é a acumulação de proteína β amilóide (Ap) e a deposição de amilóide na microvascularização (angiopatia amilóide). Verifica-se também a existência de degenerescência granulo-vacuolar, perda de neurónios, substância branca e sinapses, gliose, inflamação e lesões oxidativas.⁴

Existem evidências que sugerem que os fatores vasculares, especialmente os que afetam a microcirculação cerebral (por exemplo a hipertensão arterial e diabetes mellitus), desempenham um papel importante na patogénese da DA.⁵

Os vasos sanguíneos retinianos e cerebrais partilham características semelhantes (embrionárias, anatómicas e fisiológicas), tais como as barreiras hemato-encefálica, hemato-retiniana e a circulação terminal não anastomótica.⁶ Berisha *et al.* publicaram, em 2007, estudos que descrevem alterações na vascularização retiniana de doentes com DA ligeira ou moderada, descrevendo uma visível redução do diâmetro das veias e uma diminuição do fluxo sanguíneo arterial quando comparado com indivíduos sem doença.⁷

A coróide parece estar afetada em muitas doenças da retina, estando descritas alterações (diminuição) na degenerescência macular precoce e mesmo no envelhecimento saudável.^{8,9} Esta diminuição da espessura da coróide é por vezes designada atrofia da coróide relacionada com a idade.¹¹ Vários estudos têm demonstrado, em ratinhos ou noutros modelos animais de DA, uma acumulação de amilóide na vascularização da coróide dependente da idade.¹²

Antes do aparecimento do OCT, era possível visualizar a coróide dos doentes através da angiografia com verde de indocianina, onde a injeção deste corante fluorescente e subsequente captação de imagens fluorescentes permitia o estudo bidimensional (2D) do seu padrão, e da existência de anomalias nas paredes dos vasos¹³. Desde o primeiro estudo de Spaide *et al.*, utilizando o EDI-OCT¹⁴, foram necessários cerca de cinco anos para serem publicados os primeiros estudos usando esta tecnologia para avaliar a espessura da coróide em doentes com DA. A espessura da

coróide tem sido descrita como diminuída em doentes com DA em comparação com controlos em trabalhos originais¹⁵⁻¹⁷ e de revisão.¹⁸

Sabendo que o fator idade está fortemente associado à diminuição da espessura da coróide, o presente estudo teve como objetivo identificar fatores que poderiam explicar as diferenças entre a espessura em doentes com DA ligeira e doentes mais idosos sem DA.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. População

Estudo transversal observacional realizado nos Departamento de Oftalmologia e Neurologia do Centro Hospitalar de Lisboa Central, entre outubro de 2014 e abril de 2016. Doentes consecutivos com DA foram enviados pelo Departamento de Neurologia para avaliação oftalmológica, onde foram verificados os critérios de inclusão/exclusão. Foram incluídos doentes com critérios clínicos de DA e valores no Mini-Mental State Examination (MMSE) entre 21 e 26 com olhos normotensos, acuidade visual superior a 4/10 e com capacidade de compreender o estudo.

Os critérios de exclusão foram: erro refrativo > 5 dioptrias (D) e/ou comprimento axial > 25 mm no olho em estudo; diagnóstico de retinopatia diabética ou de outras doenças da retina; glaucoma ou hipertensão ocular; uveíte; doença neurodegenerativa; opacidades significativas dos meios que impedissem as imagens do fundo ocular. Para além disso, os doentes com outra patologia neurológica conhecida relevante, tal como doença neurodegenerativa outros tipos de demência, AVC prévio, ou diagnóstico incerto/indeterminado, foram excluídos.

Foi obtido o consentimento informado dos doentes e o estudo foi aprovado pelo Comité de Ética do CHLC e da NOVA Medical School. Os princípios da Declaração de Helsínquia foram respeitados.

Foram recrutados 50 doentes para o grupo DA (GDA) com idades entre 65 e 78 anos, e 50 indivíduos com idade superior a 78 anos sem DA para o grupo controlo (GC). De cada doente foi selecionado aleatoriamente um dos olhos.

2. Métodos

Após uma visita de pré-triagem, onde a história oftalmológica, exame oftalmológico completo, com acuidade visual, exame do segmento anterior, tonometria

por aplanção de Goldmann, oftalmoscopia indireta e biometria ultrassônica foram registados, os doentes foram designados para uma consulta específica. Nesta consulta foram captadas as imagens obtidas por EDI-OCT, realizadas as medições das Pressões Arteriais (PA) Sistólica, Diastólica e Média e registadas as medicações anti-hipertensoras e diuréticas.

2.1. Acuidade Visual

A melhor acuidade visual corrigida (MAVC) foi aferida utilizando as tabelas de Snellen e convertida para o logaritmo do ângulo mínimo de resolução (logMAR).

2.2. Pressão intraocular

A pressão intraocular (PIO) foi medida, antes de se proceder à dilatação pupilar, com tonometria de aplanção *Goldmann* e registada a média de 3 medições.

2.3. SD-OCT *Spectral Domain - Optical Coherence Tomography Imaging*

Todos os olhos foram examinados com SD-OCT (*Spectralis Heidelberg Engineering, Germany*), tendo sido obtidas grelhas maculares (20^o por 20^o), compostas por 25 *scans* horizontais. Todas as leituras foram realizadas no modo de EDI para melhorar a qualidade de imagem da coróide de acordo com o método previamente descrito.²² A coróide foi fotografada pelo posicionamento do dispositivo SD-OCT perto o suficiente do olho para obter uma imagem invertida. Todos os exames de OCT foram realizadas no mesmo horário, entre as 14:00 e as 16:00 horas. As imagens foram obtidas por um técnico de ortóptica e foram avaliados por dois oftalmologistas (J.P.C. & R.P.P) independentemente um do outro, mascarados para o diagnóstico dos doentes. A espessura da coróide foi medida manualmente a partir da linha hiperrefletiva correspondente ao epitélio pigmentado da retina até à linha hiporrefletiva correspondente à interface coróide-escleral. Estas medições foram feitas na coróide subfoveal, e em intervalos de 500 µm a partir da fóvea, até aos 1500mm nasais, temporais, superiores e inferiores (13 localizações) (Fig. 1).

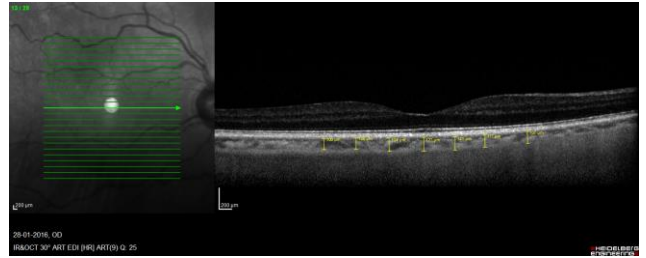


Figura 1 - Espessura da coróide. As medições foram realizadas em 13 localizações: subfoveal e em intervalos de 500 µm a partir da fóvea até 1500 µm nasal, 1500 µm temporal, 1500 µm superior e 1500 µm inferior.

2.4. Pressão Arterial Média

A pressão arterial foi medida em posição sentada por um esfigmomanómetro automático e as pressões arteriais sistólica e diastólica (PAS e PAD) foram registadas. A pressão arterial média (PAM) foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$PAM = PAD + 1/3 (PAS - PAD)$$

3. Análise estatística

As características demográficas e clínicas dos doentes foram descritas com frequências (percentagens) e com médias (DP: desvio padrão) ou com medianas e intervalos interquartil (IQR: percentil 25 percentil-75), conforme o caso. Foram aplicados testes não paramétricos de Qui-quadrado e Mann-Whitney. Foram utilizados modelos de regressão linear para identificar as variáveis que explicam a variabilidade da espessura da coróide nos dois grupos. As variáveis sexo, idade, PIO, comprimento axial, equivalente esférico, PAM e acuidade visual foram consideradas nesta análise. As variáveis que atingiram um valor de $p < 0,25$ na análise univariável foram selecionadas como candidatas para os modelos multivariados. Foi verificada a normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov de qualidade de ajuste com correção de Lilliefors. Um nível de significância $\alpha=0,05$ foi considerado. Os dados foram analisados usando o *Statistical Package for the Social Science for Windows (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.)*.

RESULTADOS

1. Características clínicas e demográficas dos doentes

Foram incluídos neste estudo um total de 50 doentes com DA (16 do sexo masculino) e 50 indivíduos mais idosos sem DA (17 homens).

A média de idade foi de 73,1 (DP=5,36) anos para o GDA e 82,1 anos (DP=3,67) anos para o GC, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Em relação ao sexo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos ($p=0,832$).

Em relação à melhor acuidade visual e ao equivalente esférico também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,001$ e $p=0,021$, respetivamente). Não foram encontradas outras diferenças significativas entre os grupos (Quadro I).

Quadro I - Características Demográficas e Clínicas.

	Grupo Alzheimer (n=50)	Grupo Controlo (n=50)
Idade (anos) Média (DP)	73,0 (5,36)	82,14 (3,67)
Sexo masculino (n;%)	16 (32%)	17 (34%)
MAVC (logMAR)	0,121 (0,153)	0,038 (0,066)
PIO (mmHg)	15,52 (2,62)	14,54 (2,32)
Equivalente Esférico (D)	0,995 (1,43)	0,267 (1,80)
Comprimento Axial (mm)	22,44 (0,91)	2248 (0,96)
PAM	98,91(94,67-103,33)	97,84 (94,00-100,42)

Os resultados são expressos em média e desvio padrão (DP) ou mediana (IQR: P25 - P75). (MAVC – melhor acuidade visual corrigida; PIO – pressão intraocular, PAM – pressão arterial média)

Quadro II – Espessura da coróide (μm) nas 13 localizações.

Localização	Grupo Alzheimer (n=50)	Grupo controlo (n=50)	Valor p
Subfoveal central	169,02 (55,03)	189,58 (55,93)	$p = 0,032$
Temporal 500 μm	163,26 (52,34)	186,12 (52,59)	$p = 0,013$
Temporal 1000 μm	163,12 (50,31)	185,44 (54,96)	$p = 0,027$
Temporal 1500 μm	170,76 (47,24)	178,52 (53,89)	$p = 0,450$
Nasal 500 μm	156,64 (55,32)	172,48 (56,12)	$p = 0,099$
Nasal 1000 μm	150,46 (58,18)	166,06 (57,12)	$p = 0,076$
Nasal 1500 μm	137,60 (59,82)	156,34 (60,59)	$p = 0,084$
Superior 500 μm	170,58 (57,95)	186,40 (56,01)	$p = 0,113$
Superior 1000 μm	173,68 (59,32)	190,44 (56,38)	$p = 0,111$
Superior 1500 μm	179,50 (60,09)	189,50 (55,78)	$p = 0,398$
Inferior 500 μm	160,86 (65,91)	177,04 (55,51)	$p = 0,091$
Inferior 1000 μm	159,66 (64,76)	174,40 (62,30)	$p = 0,229$
Inferior 1500 μm	161,98 (74,56)	159,70 (60,63)	$p = 0,839$

2. EDI-OCT

Apesar de uma diferença global não significativa na espessura da coróide, houve uma tendência geral para uma diminuição nos doentes com DA, em comparação com o grupo controlo, com espessuras que variam de 137,60 a 179,50 μm e 156,34 a 190,44 μm , respetivamente. Esta tendência foi estatisticamente significativa em três localizações: subfoveal, 500 e 1000 μm temporais à fóvea ($p=0,032$; $p=0,013$ e $p=0,037$, respetivamente).

A descrição detalhada da espessura da coróide de ambos os grupos encontra-se expressa no Quadro II.

Os resultados da análise univariável para as restantes variáveis podem ser observados nas tabelas suplementares.

DISCUSSÃO

Um dos problemas mais importantes no diagnóstico precoce da doença de Alzheimer é a incapacidade de visualizar diretamente as alterações de uma única célula, em tempo real, no cérebro. Com a tecnologia OCT quase conseguimos fazê-lo no olho, de uma forma não-invasiva.

A coróide é uma estrutura altamente vascular e, similarmente a qualquer microvasculatura do corpo humano, é suscetível de sofrer alterações estruturais e funcionais com a idade.¹⁴ Isto envolve geralmente uma redução da perfusão para a retina externa, o que pode ter um impacto sobre a função visual. De acordo com estudos histológicos, a espessura da coróide subfoveal humana é de aproximadamente 194 μm ao nascimento e diminui para cerca de 80 μm até a idade de 90 anos.²⁰

O papel principal da coróide é fornecer oxigénio para a retina externa até à camada nuclear interna e à retina neurosensorial na zona avascular foveal.¹³ Alterações vasculares da coróide podem ocorrer em doentes com fatores de risco vasculares, como é o caso da maioria dos doentes com DA.⁵

Estudos *in vivo* demonstraram que a espessura da coróide varia topograficamente no pólo posterior, e está inversamente relacionada com a idade, diminuindo cerca de 16 μm por cada década de vida.^{20,21}

Um estudo realizado por Wakatsuki et al. que analisou 54 olhos, demonstrou que a espessura da coróide era maior na localização subfoveal e menor na região nasal.²⁰ É possível encontrar na literatura dados diferentes dos nossos. Shin *et al.*²² encontraram uma espessura média da coróide de 285,9 μm (DP=53,0), mais espesso que os 186,1 μm (DP=52,6) do nosso grupo controlo. A razão para esta discrepância entre Shin *et al.* e o nosso grupo de estudo baseia-se na metodologia de medição da coróide, e na idade média das populações (45,28 versus 82,12 anos de idade). Outro estudo realizado na China²³ comparou 70 doentes com mais de 60 anos de idade, com 140 doentes mais jovens, concluindo que a espessura da coróide do grupo com mais de 60 anos de idade era menor do que a dos indivíduos com menos de 60 anos de idade, e muito semelhante aos nossos resultados, se tivermos em conta a taxa de diminuição da espessura da coróide por ano. De acordo com vários estudos, a espessura da coróide diminui entre 0,72 μm a 2,98 μm por ano, conforme descrito em vários estudos.^{21,24-27}

Além da idade, também o comprimento axial e a refração influenciam a espessura da coróide, pelo que devemos ter em conta a importância do controlo dessas variáveis quando se estuda qualquer população de doentes.^{28,29} Não menos interessante é o facto da espessura da coróide ter um ritmo circadiano, e poder variar até 33 μm (variando de 8 a 65 μm), o que sugere que a medição da coróide poder ser altamente variável e enfatiza ainda mais a necessidade de desenvolver novas abordagens para a avaliar de forma fiável *in vivo*.^{29,30}

Doentes com DA têm alterações na rede microvascular retiniana (vénulas retinianas com lumens estreitados e vasos retinianos tortuosos) em comparação com controlos.³¹⁻³³ A acumulação de β -amilóide e o desenvolvimento de emaranhados neurofibrilares (NFT) causam neurotoxicidade, perda neuronal/sináptica e angiopatia vascular.³⁴

Acreditamos que este seja o primeiro estudo a comparar a espessura da coróide com SD-OCT, entre doentes com DA e indivíduos sem DA mais idosos. A menor espessura da coróide na DA, mesmo quando comparada com indivíduos mais idosos, pode reforçar a importância do factor vascular na patogénese desta doença e corrobora os resultados de outros estudos anteriores, que apenas comparavam doentes com grupos controlo com idades semelhantes.¹⁵⁻²⁰

No nosso estudo, seleccionámos um olho por doente, e todos os exames foram realizados à mesma hora do dia. Na análise multivariada, após ajuste para sexo, acuidade visual, pressão intraocular, comprimento axial, equivalente esférico e, a espessura da coróide continua a ser menor em todas as localizações quando comparado com o grupo controlo. Como noutros estudos^{16,17}, as medições centrais têm diferenças mais significativas, razão pela qual a significância estatística foi observada em 3 locais mais perto da fóvea: subfoveal, 500 e 1000 μm temporais à fóvea.

Quando analisámos o padrão de espessura da coróide nos dois grupos (DA e controlo), ambos têm uma distribuição normal da espessura da coróide¹⁴, com um quadrante superior mais espesso do que o inferior e o temporal com maior espessura do que o quadrante nasal.

Os modelos de regressão linear multifatorial para a espessura da coróide como variável dependente apoiaram a importância da doença de Alzheimer como um possível fator de risco para a atrofia da coróide, para além do envelhecimento expectável com a idade. Esta diminuição da espessura da coróide observada nos doentes com DA poderá

estar relacionada com atrofia da coróide secundária a angiopatia amilóide, correspondente a uma possível coroidopatia amilóide da demência de Alzheimer, distinta da atrofia da coróide relacionada com a idade.

O nosso estudo teve algumas limitações: em primeiro lugar, as medições da espessura da coróide foram realizadas manualmente. No entanto, estas medições foram confirmadas por 2 observadores independentes e esta técnica manual já demonstrou uma elevada reprodutibilidade intra e inter-observador.³⁵ Em segundo lugar, o estado de hidratação que pode afetar a espessura da coróide não foi tido em conta, apesar de, para tentar diminuir qualquer variação circadiana, executámos as medições no mesmo horário e no mesmo local.

A sensibilidade da imagem da coróide com SD-OCT foi melhorada através da tecnologia EDI-OCT, e acreditamos que a angiografia com tomografia de coerência ótica (OCTA), poderá fornecer informações importantes através da imagem volumétrica tridimensional da vascularização da retina e coróide em estudos futuros.

CONCLUSÃO

Os doentes com DA, quando comparados com um grupo controlo mais velho, têm uma tendência geral para a diminuição da espessura da coróide, com 3 localizações próximas da fóvea, com diferenças estatisticamente significativas. Esta diminuição da espessura da coróide pode refletir a importância do fator vascular na patogénese da doença, e pode ajudar no diagnóstico de "Coroidopatia amilóide do Alzheimer" não relacionada com a idade.

Mais estudos clínicos e tomográficos devem ser realizados para confirmar que esta coroidopatia associada à doença de Alzheimer que observámos pode preceder, em mais de 10 anos, a atrofia coróideia relacionada com a idade.

BIBLIOGRAFIA

1. Association, A. 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dementia*. Assoc. A. 2012 *Alzheimer's Dis. facts Fig. Alzheimer's Dement.* 8, 131–168 (2012). 8, 131–168 (2012).
2. Torre, J. C. De. Personal view Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and diuretics. 3, 184–190 (2004).
3. Kalaria, R. N. The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. 21, 321–330 (2000).
4. Perl, D. P. Neuropathology of Alzheimer's Disease. 77, 32–42 (2010).
5. Kalaria, R. N., Akinyemi, R. & Ihara, M. Journal of the Neurological Sciences Does vascular pathology contribute to Alzheimer changes? *J. Neurol. Sci.* 322, 141–147 (2012).
6. Patton, N. *et al.* Retinal vascular image analysis as a potential screening tool for cerebrovascular disease. *J. Anat.* 206, 318–348 (2005).
7. Berisha, F., Feke, G. T., Trempe, C. L., Mcmeel, J. W. & Schepens, C. L. Retinal Abnormalities in Early Alzheimer's Disease. 48, 6–10 (2007).
8. Mullins, R. F., Johnson, M. N., Faidley, E. A. & Skeie, J. M. Choriocapillaris Vascular Dropout Related to Density of Drusen in Human Eyes with Early Age-Related Macular Degeneration AND. 1606–1612 (2010). doi:10.1167/iovs.10-6476
9. Mcleod, D. S. *et al.* Relationship between RPE and Choriocapillaris in Age-Related Macular Degeneration. 4982–4991 (2016). doi:10.1167/iovs.09-3639
10. IJirattanasopa, P. *et al.* Complement Factor H in Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy. (2016). doi:10.1167/iovs.12-9619
11. Spaide, R. F. Age-Related Choroidal Atrophy. *AJOPHT* 147, 801–810 (2009).
12. Gh, A. & Rosen, R. B. Progress in Retinal and Eye Research Combinations of techniques in imaging the retina with high resolution. 27, 464–499 (2008).
13. Laviers, H. & Zambarakji, H. Enhanced depth imaging-OCT of the choroid: a review of the current literature. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 252, 1871–1883 (2014).
14. Margolis, R. & Spaide, R. F. A Pilot Study of Enhanced Depth Imaging Optical Coherence Tomography of the Choroid in Normal Eyes. *Am. J. Ophthalmol.* 147, 811–815 (2009).
15. Gharbiya, M., Trebbastoni, A., Parisi, F. & Manganiello, S. Choroidal Thinning as a New Finding in Alzheimer's Disease: Evidence from Enhanced Depth Imaging Spectral Domain Optical Coherence Tomography. 40, 907–917 (2014).
16. Bulut, M. *et al.* Choroidal Thickness in Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Type

- Dementia. 2016, (2016).
17. Bayhan, H. A., Aslan Bayhan, S., Celikbilek, A., Tanik, N. & Grdal, C. Evaluation of the chorioretinal thickness changes in Alzheimer's disease using spectral-domain optical coherence tomography. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 43, 145–151 (2015).
 18. Cunha, J. P. Valejo-Coelho, N. *et al.* Alzheimer's disease : A review of its visual system neuropathology . Optical coherence tomography — a potential role as a study tool in vivo. (2016). doi:10.1007/s00417-016-3430-y
 19. Cunha JP *et al.* Choroidal thinning: Alzheimer's disease and aging. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2017 Mar 30;8:11-17. doi: 10.1016/j.dadm.2017.03.004.
 20. Ramrattan, R. S. *et al.* Morphometric Analysis of Bruch's Membrane, the Choriocapillaris, and the Choroid in Aging. 3, (2016).
 21. Wakatsuki, Y., Shinojima, A., Kawamura, A. & Yuzawa, M. Correlation of Aging and Segmental Choroidal Thickness Measurement using Swept Source Optical Coherence Tomography in Healthy Eyes. 1–14 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0144156
 22. Shin, J. W., Shin, Y. U. & Lee, B. R. Choroidal Thickness and Volume Mapping by a Six Radial Scan Protocol on Spectral- Domain Optical Coherence Tomography. *OPHTHA* 119, 1017–1023 (2011).
 23. Ding, X. *et al.* Choroidal Thickness in Healthy Chinese Subjects AND. 1–6 (2016). doi:10.1167/iovs.11-8076
 24. Zhang, L. *et al.* Automated Segmentation of the Choroid from Clinical. 53, 7510–7519 (2016).
 25. Chen, Q. *et al.* Automated choroid segmentation based on gradual intensity distance in HD-OCT images. 23, 119–123 (2015).
 26. Esmaeelpour, M. *et al.* Choroid, Haller's, and Sattler's layer thickness in intermediate age-related macular degeneration with and without fellow neovascular eyes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 5074–5080 (2014).
 27. Agawa, T., Miura, M. & Ikuno, Y. Choroidal thickness measurement in healthy Japanese subjects by three-dimensional high-penetration optical coherence tomography. 1485–1492 (2011). doi:10.1007/s00417-011-1708-7
 28. Barteselli, G. *et al.* Choroidal Volume Variations with Age, Axial Length, and Sex in Healthy Subjects : A Three-Dimensional Analysis. V, 2572–2578 (2012).
 29. Chakraborty, R., Read, S. A. & Collins, M. J. Diurnal Variations in Axial Length , Choroidal Thickness , Intraocular Pressure , and Ocular Biometrics. 52, (2016).
 30. Usui, S. *et al.* Circadian Changes in Subfoveal Choroidal Thickness and the Relationship with Circulatory Factors in Healthy Subjects. 53, 1–3 (2016).
 31. Choi, W. *et al.* Choriocapillaris and choroidal microvasculature imaging with ultrahigh speed OCT angiography. *PLoS One* 8, (2013).
 32. Williams, M. A. *et al.* Retinal microvascular network attenuation in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.* 1, 229–235 (2015).
 33. Cheung, C. Y. *et al.* Microvascular network alterations in the retina of patients with Alzheimer ' s disease. *Alzheimer's Dement.* 10, 135–142 (2014).
 34. Tzekov, R. & Mullan, M. ScienceDirespessura da coróidet. 1–20 (2013).
 35. Shao, L. *et al.* Reproducibility of subfoveal choroidal thickness measurements with enhanced depth imaging by spectral-domain optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 230–3 (2013).