

Parâmetros Quantitativos em OCT-A em doentes com Neovascularização Secundária à Degenerescência Macular relacionada com a idade

Diogo Reis-Cabral^{1,2}; Pedro Rodrigues¹; Telmo Pereira²; Pedro Camacho^{3,4}; Marta Vila-Franca⁵; Florence Coscas^{6,7}; Paulo Caldeira-Rosa⁸; Victor Ágoas⁹; Gabriel Coscas^{6,7}

¹ Interno de Formação Específica em Oftalmologia, Instituto de Oftalmologia Dr. Gama Pinto, Lisboa

² CEDOC, NOVA Medical School I Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa

³ Ortopista, Instituto de Oftalmologia Dr. Gama Pinto, Lisboa

⁴ Professor Adjunto Convidado, ESTeSL, Lisboa

⁵ Assistente Hospitalar, Instituto de Oftalmologia Dr. Gama Pinto, Lisboa

⁶ Centre Ophtalmologique de l'Odeon, Paris, France

⁷ Department of Ophthalmology, Centre Hospitalier Intercommunal de Creteil University Paris Est Creteil, Creteil, France

⁸ Assistente Hospitalar Graduado, Instituto de Oftalmologia Dr. Gama Pinto, Lisboa

⁹ Chefe de Serviço, Instituto de Oftalmologia Dr. Gama Pinto, Lisboa

RESUMO

Objetivo: Estudar a correlação entre o número de tratamentos e os parâmetros quantitativos em OCT-A da neovascularização corioideia (NVC) secundária à degenerescência macular relacionada com a idade (DMIn).

Métodos: Estudo transversal após amostragem consecutiva de doentes com DMIn exsudativa (grupo 1) e indivíduos sem patologia vascular (grupo 2). Avaliação imagiológica (retinografia; OCT-B; OCT-A) e do processo clínico (número de injeções intravítreas (IIV); duração da doença). No grupo 1 foi analisada a camada retiniana externa avascular e no grupo 2 o complexo vascular superficial. As NVC foram delineadas automaticamente em Matlab. A análise quantitativa envolveu: área, densidade vascular (DV), lacunaridade e análise da dimensão fractal (DF). A análise estatística compreendeu comparação de médias e associação entre as variáveis de interesse.

Resultados: Inclusão de 131 doentes (131 olhos): idade média 78.38 +/- 9.7 anos, 34% eram mulheres (comparação de médias entre grupos $p > 0.05$). No grupo 1 o número médio de IIV foi 23.4 +/- 15 e a duração da doença média 56.8 +/- 33.3 meses. O valor médio da área vascular foi 3.6 +/- 3.2 mm²; a DV 45.5 +/- 13.7%; a lacunaridade 1.95 +/- 0.6 e a DF 1.35 +/- 0.13. No grupo 2 o valor médio da DF foi 1.63 +/- 0.04 ($p < 0.01$). Verificou-se: associação entre duração da doença e: número de IIV ($r=0.763$, $p<0.01$), DF ($r=0.321$, $p<0.01$) e DV ($r=-0.183$, $p=0.02$); correlação linear moderada entre a DF e o número de IIV ($r = 0.431$, $p < 0,01$).

Conclusões: A análise da dimensão fractal pode ser um biomarcador útil na avaliação quantitativa da resposta ao tratamento com fármacos intravítreos.

Palavras-chave: degenerescência macular relacionada com a idade; factor de crescimento anti-endotélio vascular; análise da dimensão fractal; neovascularização coroideia; tomografia de coerência óptica-angiografia.

ABSTRACT

Objective: To study the correlation between the number of treatments and OCT-A quantitative analysis of choroidal neovascularization (CNV) secondary to age related macular degeneration (AMD).

Methods: Retrospective review of the medical records of consecutive patients with exudative AMD observed during re-treatment (group 1) and patients without vascular diseases (group 2). All patients underwent funduscopy evaluation, Swept-source Optical Coherence Tomography-Angiography (SS-OCT-A) and OCT-B scans. CNVs delineation and quantitative analysis were performed automatically using Matlab. In group 2, FD of the superficial retinal plexus was accessed. The statistical analysis comprised means comparison and investigation of association between variables of interest using univariate and multivariate stepwise linear regression analysis.

Results: 126 patients (126 eyes) were included in this study. The mean age in the cohort was 79.5 ± 8.9 years, 97 (77%) were female patients Groups were age and sex matched. In group 1, the mean intravitreal injections number (IVI) was 21 ± 12 ; mean disease duration was 56.8 ± 33.3 months; mean area was 3.64 ± 3.2 mm²; mean vessel density was $45.50 \pm 13.7\%$; mean lacunarity was 1.95 ± 0.6 and mean FD was 1.35 ± 0.13 . In group 2, the mean FD was 1.63 ± 0.04 ($p < 0.01$). Disease duration was associated positively with IVI ($r = 0.763$, $p < 0.01$), FD ($r = 0.321$, $p < 0.01$) and VD ($r = -0.183$, $p = 0.02$). There was a moderate linear relationship between FD and the number of IIV ($r = 0.431$, $p < 0.01$),

Conclusion: Fractal dimension analysis can be a valuable biomarker in the quantitative assessment of CNV changes after anti-VEGF therapy.

Keywords: age-related macular degeneration; anti vascular endothelial growth factor agents; lacunarity; fractal dimension analysis; choroidal neovascularisation; Optical coherence tomography angiography.

INTRODUÇÃO

Nos países desenvolvidos, a degenerescência macular relacionada com a idade (DMI) avançada é uma das principais causas de cegueira nos idosos.¹ A neovascularização coroideia (NVC) é uma das formas da DMI avançada e é caracterizada pelo crescimento de neovasos sanguíneos que atravessam a membrana de Bruch

e se localizam sob o epitélio pigmentado da retina (NVC tipo 1) ou no espaço subretiniano (NVC tipo 2).²

Atualmente, o standard no tratamento da NVC são as injeções intravítreas de anticorpos anti-factor de crescimento vascular endotelial (anti-VEGF), que permitem o controlo da atividade e regressão das membranas neovasculares.³ A monitorização da resposta à terapêutica é habitualmente realizada recorrendo à

avaliação da melhor acuidade visual corrigida (MAVC), à fundoscopia e, em especial, à Tomografia de Coerência Óptica (OCT-estrutural) - preferida por ser rápida e não-invasiva. Este controlo baseia-se em mapas de espessura retiniana e na presença de sinais indiretos de neovascularização, como a presença de líquido sub- ou intra-retiniano ou descolamentos do epitélio pigmentado.^{3,4}

A OCT-Angiografia (OCT-A) tem sido introduzida como um complemento imagiológico capaz de fornecer algumas das informações obtidas pela angiografia fluoresceínica (AF) de uma forma mais rápida e segura.⁵ Em alguns estudos, a OCT-A é tão sensível como a AF no diagnóstico e decisão terapêutica através da avaliação qualitativa das membranas neovasculares.^{6,7} Esta avaliação tem por base características morfológicas que podem indicar atividade neovascular (ramificações periféricas finas, arcada vascular periférica, ansas vasculares, halo hipointenso perilesional) ou sinais de maturação após tratamento (vasos maduros rarificados, vasos filamentosos longos e aspecto em “árvore morta”).⁶⁻¹³ No entanto, a avaliação qualitativa está associada a um componente subjetivo importante, pelo que tem havido um interesse crescente na análise de parâmetros quantitativos, como a área e a densidade vascular. Contudo, não obstante estarem as variações da área e densidade associadas à terapêutica anti-VEGF, o uso destes parâmetros é limitado por caracterizarem insuficientemente a morfologia da NVC e dependerem de uma delineação manual.¹⁴⁻¹⁸

Os fractais são padrões encontrados nas estruturas biológicas e apresentam a característica de self-similarity em diferentes ampliações. A análise da dimensão fractal (DF) quantifica o preenchimento espacial e permite, deste modo, caracterizar uma estrutura em termos de complexidade.¹⁹ A lacunaridade é um parâmetro complementar à DF e que caracteriza a textura da imagem através da quantificação dos espaços vazios.²⁰ Estudos prévios demonstraram que os vasos da camada superficial da retina seguem a teoria dos fractais e quantificaram a sua complexidade através de imagens de retinografia e AF, obtendo um valor normal de 1.7.²⁰ Estudos em membranas neovasculares tumorais demonstraram que estas têm um padrão de crescimento que pode ser caracterizado com recurso à análise fractal.²¹ *In vitro* foi demonstrado que as membranas neovasculares expostas a agentes anti-VEGF assumem uma organização progressivamente normal ao longo dos tratamentos.^{22,23} Contudo, a confirmação *in vivo* destes achados ainda não foi conseguida pela limitação de

observar o crescimento dos neovasos tumorais com elevada resolução.²⁴

O objectivo deste estudo foi realizar a análise quantitativa de NVC sob tratamento anti-angiogénico e estudar a associação entre a dimensão fractal e o tratamento anti-VEGF realizado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do Estudo

Estudo retrospectivo transversal com revisão dos processos clínicos de pacientes consecutivos diagnosticados com DMI exsudativa e seguidos no Centre *Ophthalmologique de l'Odeon* entre junho de 2016 e junho de 2017 (Grupo A) e de doentes sem patologia ocular e sem patologia vascular sistémica observados no Instituto de Oftalmologia Dr. Gama Pinto (IOGP) entre janeiro e agosto de 2017 (Grupo B). Este estudo foi conduzido respeitando as normas da Declaração de Helsínquia (1964) e teve a aprovação dos comités de ética locais.

Participantes

Os critérios de inclusão do Grupo A foram:

- diagnóstico de DMI exsudativa realizado por um especialista em retina (F.C; G.C) recorrendo a imagiologia multimodal (OCT-B, FA and ICG);
- Neovascularização coroideia de tipo 1;
- pelo menos uma injeção intravítrea de anti-VEGF (IIV) nos 3 meses anteriores, administrada de acordo com o esquema de tratamento *pro re nata*.

Os critérios de inclusão no Grupo B foram:

- ausência de patologia ocular conhecida;
- ausência de patologia sistémica microvascular (como hipertensão arterial ou diabetes mellitus).

Crítérios de exclusão para ambos os grupos incluíram: neovascularização coroideia do tipo 2 ou tipo 3; vasculopatia coroideia polipoide; outras doenças retinianas com potencial de desenvolverem neovascularização coroideia secundária; membrana neovascular ultrapassando a área de 4.5x4.5mm da OCT-A; sinal fraco devido a descolamento do epitélio pigmentado vascularizado; hipertensão arterial; diabetes *mellitus*; má qualidade de imagem na OCT-A (SSI inferior a 80).

O diagnóstico do tipo de neovascularização coroideia foi feito recorrendo à imagiologia multimodal inicial, incluindo angiografia fluoresceínica, verde de indocianina e OCT-B estrutural. A CNV de tipo 1 activa foi definida como exsudação hiperfluorescente tardia e *pin-points* na angiografia fluoresceínica; descolamento do epitélio pigmentado vascularizado na angiografia com verde de indocianina; descolamento do epitélio pigmentado e fluídos intra e/ou subretiniano na OCT-B.²⁵⁻²⁷

Todos os doentes beneficiaram de 1 dose de carga de 3 injeções mensais de anti-VEGF seguida de um esquema de tratamento *pro re nata* (PRN). Os critérios de retratamento incluíam qualquer evidência de atividade da doença no OCT estrutural (fluído intra ou subretiniano, presença de descolamento de epitélio pigmentado) e/ou a presença de hemorragias maculares na fundoscopia.^{3,28}

Origem dos Dados

Foram recolhidos os seguintes dados: idade e género; melhor acuidade visual corrigida (MAVC, tabela ETDRS); duração da doença; número de tratamentos intravítreos anti-VEGF efetuados.

Foram realizados os seguintes exames complementares de diagnóstico: retinografias do pólo posterior, OCT-estrutural e OCT-A *swept-source*.

Aquisição da imagem e análise

As imagens de OCT-estrutural foram captadas com Enhanced Depth Imaging (EDI) Spectral domain OCT com protocolo automatizado de volume com 49 B-scans de 30° centrados na fóvea com o dispositivo *Spectralis* OCT (Heidelberg Engineering, Inc., Heidelberg, Germany).

As imagens OCT-A foram captadas pelo protocolo de 4.5x4.5mm centrado na fóvea com o dispositivo DRI OCT Triton® (Topcon, Tokyo, Japan). O software remove automaticamente artefactos de projecção do efeito de “sombra inversa” dos vasos retinianos.²⁹ Nos doentes do grupo A, foram avaliadas as camadas da retina externa entre a camada plexiforme externa e a membrana de Bruch para excluir anomalias do fluxo sanguíneo sugestivas de CNV.^{15,24,30} Nos doentes do grupo B, foram avaliadas as camadas do plexo vascular superficial da retina, definido como o plexo localizado entre a camada de fibras nervosas e a camada de células ganglionares. As imagens foram exportadas em formato Tagged Image File Format (TIFF) para análise. As imagens foram processadas e analisadas

recorrendo ao open-source software ImageJ (public domain software; National Institutes of Health, Bethesda, MD)³¹ e a uma interface gráfica do utilizador (IGU) programada em linguagem MATLAB (MATLAB 8.0 and Statistics Toolbox 8.1, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, EUA). O primeiro passo do processamento foi realizado em ImageJ e consistiu na binarização da imagem (método de Otsu³²) e na filtragem do ruído de fundo e de estruturas não específicas pela exclusão de valores de Dimensão Fractal Local (DFL).^{19,33} A DFL categoriza cada pixel de acordo com a sua complexidade e estrutura utilizando o conjunto de pixéis conectados para produzir uma distribuição da variação de complexidade local. Quanto mais complexo e contínuo o padrão, mais alto o valor medido. Esta técnica permitiu-nos excluir os pixéis não conectados linearmente ($LCFA < 1.00$) (Figura 1). As imagens foram exportadas em formato TIFF e trabalhadas com o software integrado na IGU, que permitiu realizar delinear a da membrana neovascular automaticamente utilizando algoritmos customizados (Figura 2). Esta delimitação tinha sempre a possibilidade de ser ajustada (recorrendo a uma ferramenta de ajuste integrada) ou aceite por dois observadores independentes e mascarados entre si (D.C e F.C). As discordâncias foram resolvidas por um terceiro elemento (G.C).

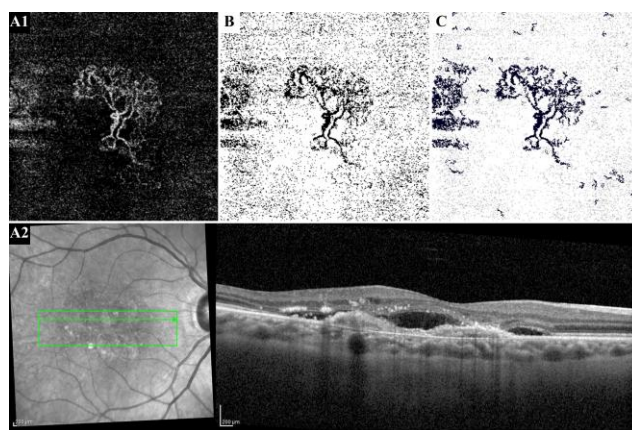


Figura 1 – Imagens de Tomografia de Coerência Óptica – Angiografia (OCT-A) que demonstram o processo de filtragem de ruído de fundo no caso de uma doente com uma neovascularização coroideia do tipo 1. A) Imagem da região avascular (janela de 4.5x4.5) em OCT-A (A1) e OCT estrutural modo B correspondente (A2). B) Binarização da imagem pelo método de Otsu. C) Filtro do ruído de fundo utilizando a dimensão fractal local (DFL) – eliminação de todos os pixéis não conectados linearmente ($DFL < 1.00$).

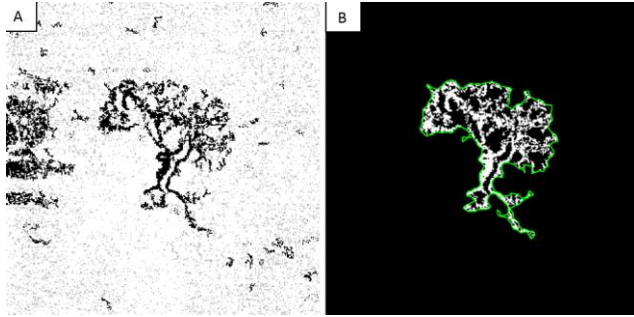


Figura 2 – Imagens de Tomografia de Coerência Óptica – Angiografia (OCT-A) e sua análise pela interface gráfica do utilizador programada. A) Imagem da região avascular (janela de 4.5x4.5) e análise preliminar pela plataforma antes da análise da imagem. B) Imagem obtida após binarização pelo método de Otsu, identificação e delimitação automática da membrana neovascular.

Após a delimitação automática, a IGU permitiu o cálculo automático de parâmetros quantitativos que incluíram: área da membrana neovascular, proporção entre os eixos maior e menor, densidade vascular, DF e lacunaridade. A densidade vascular foi definida como a percentagem de área da membrana ocupada por vasos. O cálculo da DF foi realizado através do método *box-counting*²⁰ após esqueletonização das imagens, como descrito previamente.³⁴ A DF varia com a organização dos vasos esqueletonizados e tem um valor entre 0 e 2 – quanto maior o valor, maior a organização vascular.³⁵ A lacunaridade permite caracterizar a textura de uma imagem, medindo a heterogeneidade e os espaços vazios, complementado desta forma a análise da DF.²⁰ A análise da lacunaridade foi realizada com o algoritmo *gliding box*, como descrito previamente.³⁵ O valor obtido foi calculado como a lacunaridade média entre cada tamanho de caixa (seguindo a mesma progressão que nos cálculos da DF) – quanto maior o valor, maior a heterogeneidade. Os resultados foram exportados automaticamente para ficheiros separados para análise estatística.

Análise Estatística

A análise estatística foi feita com recurso ao programa SPSS (SPSS statistics 23 for Windows; SPSS Inc., IBM, Somers, NY). A normalidade das variáveis foi estudada pelo teste de Shapiro. A comparação entre variáveis contínuas foi realizada através do teste T-Student e entre variáveis categóricas pelo teste chi quadrado. A investigação da associação entre o tempo de duração da doença e as variáveis de interesse foi realizada por análise de regressão multivariada linear. O teste de correlação bivariada de Pearson foi utilizado para estudar correlações

lineares. Definimos como intervalo de confiança 95% e como nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Foram incluídos 131 doentes (131 olhos). A idade média na coorte foi de 78.38 +/- 9.7 anos [61-97.3] e 34% eram mulheres.

No grupo A foram incluídos 63 doentes (63 olhos). A idade média foi de 81,0 +/- 7,3 anos [62,1-97,3] e 20% dos doentes eram do sexo feminino. A MAVC foi 61,7 +/- 16 letras ETDRS [13-85], a espessura macular central média 311,2 +/- 81,8 µm, o número médio de tratamentos intravítreos 23 +/- 15 [3-70], o tempo de seguimento médio 57 +/- 33 meses [4-125] e a razão média entre tempo de seguimento/IIV de 2,9 +/- 1,4 [1-7,2]. No grupo B foram incluídos 68 doentes (68 olhos). A idade média foi de 77.0 +/- 8.4 anos [61,4-97,2] e 42% dos doentes eram do sexo feminino (tabela 1). Não foi verificada uma diferença estatisticamente significativa na comparação de idade ou sexo entre os grupos (p = 0.298 e p = 0.513, respetivamente).

Tabela 1 – Caracterização global da amostra em estudo.

	Grupo A N=63	Grupo B N=68	Valor p
Idade	81,0 +/- 7,3	77,0 +/- 8,4	0.298
Média +/- dp (Min-Max.)	(62,1-97,3)	(61,4-97,2)	
Sexo (F/M)	14 (20%) 56 (80%)	29 (42%) 39 (58%)	0.513
Olho em estudo (OE/OD)	27 (43%) 36 (57%)	38 (58%) 30 (42%)	
MAVC	61,7 +/- 16	-	-
Média +/- dp (Min-Max.)	(13-85)	-	
CMT	311,16 +/- 81,79	-	-
Média +/- dp (Min-Max.)	(185-522)	-	
Número de Tratamentos	23,35 +/- 14,97 3-70	-	-
Duração da doença	56,8 +/- 33,34 (4-125)	-	-

Legenda: dp=desvio padrão; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; EMCCMT = Espessura macular central; F=Feminino; M=Masculino; CNV=neovascularização coroideia; MAVC= Melhor acuidade visual corrigida.

No grupo A, o valor médio da área vascular foi de 3,64 +/- 3,2 mm² [0,2-12,2], o valor médio da proporção entre os eixos maior e menor 0,7 +/- 0,14 (0,35-0,94) e o valor da densidade vascular de 46,00 +/- 14,0%. O valor médio da DF foi de 1,35 +/- 0,13 [1,07-1,59] e da lacunaridade de 1,95 +/- 0,6 [0,8-3,68]. No grupo B, o valor da dimensão fractal foi de 1.63 +/- 0.04 [1.54-1.70] (tabela 2). Foi verificada uma

diferença estatisticamente significativa na comparação da DF entre os grupos ($p < 0.001$).

Tabela 2 – Caracterização global da amostra e valores obtidos estratificado por grupo de estudo

	Grupo A N=63	Grupo B N=68	Valor p
DF	1,35+/-0,13 (1,07-1,59)	1.63 +/- 0.04 (1.54-1.70)	< 0.001
Lac	1,95+/-0,60 (0,8-3,68)	-	-
Area	3,64+/-3,2 (0,2-12,2)	-	-
Densidade	0,46+/-0,14 (0,15-0,76)	--	-
Proporção eixos	0,7+/-0,14 (0,35-0,94)	-	-
Proporção tempo/número IIVs	2,72+/-1,56 (0,13-9,3)	-	-

Legenda: dp = desvio padrão; DF = Dimensão fractal; IIV – injeção Intra-Vítrea. Valores p obtidos através do teste teste T-student*.

A avaliação da associação entre a duração da doença e as características quantitativas do grupo A foi avaliada por análise multivariada linear com ajuste para idade e género. Foram obtidos valores de associação estatisticamente significativos para associação com a EMC, número de tratamentos, dimensão fractal e densidade vascular ($p < 0.05$). Não foi verificada associação estatisticamente significativa entre a duração da doença e a área lesional ou a lacunaridade. (tabela 3)

Tabela 3 – Estimativas dos coeficientes de correlação e valores obtidos por modelo de regressão linear múltipla para a duração da doença.

n=63	r	β	Valor p
EMC	-0.177	-0.078	0.023
Numero IIVs	0.763	1.9	<0.01
DF	0.321	76.361	<0.01
Lacunaridade	-0.007	5.133	0.326
Área (mm²)	0.363	-0.003	0.110
Proporção eixo maior/eixo menor	0.011	0.003	0.650
Densidade Vascular (%)	-0.183	-55.424	0.015

Legenda: EMC: espessura macular central; IIVs: Injeções Intra-Vítreas; DF: Dimensão Fractal

O estudo de correlação linear mostrou uma boa correlação entre dimensão fractal e o número de IIVs ($r = 0.431$, $p < 0,01$). A representação gráfica desta correlação pode ser observada na nuvem de pontos da figura 3.

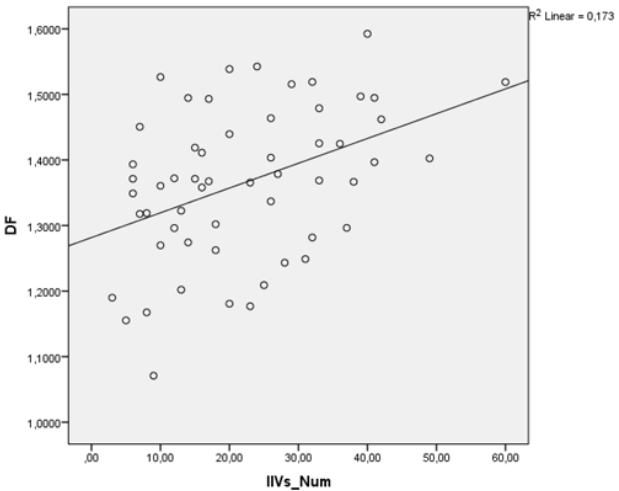


Figura 3 – Nuvem de pontos que mostra a relação linear entre o número de injeções intravítreas e o valor da dimensão fractal. (DF= dimensão fractal; IIVs_Num – número de injeções Intra-Vítreas.)

DISCUSSÃO

Atualmente o estudo das membranas neovasculares baseia-se fundamentalmente em características descritivas. A possibilidade de uma avaliação quantitativa do grau de resposta à terapêutica nas membranas neovasculares poderia constituir um ponto de viragem na abordagem destes doentes, sobretudo na planificação mais personalizada do tratamento/follow-up. Neste estudo aplicámos a análise da dimensão fractal, uma avaliação quantitativa, a imagens de membranas neovasculares activas sob tratamento por injeções intravítreas com anti-VEGF e encontramos uma boa correlação entre a organização das membranas neovasculares e o número de tratamentos por injeção intravítrea.

Propusemo-nos a estudar estrutura e a resposta ao tratamento das membranas neovasculares, mas começámos por criar um programa reprodutível e independente do operador para realizar avaliação quantitativa. O programa desenvolvido utilizou a dimensão fractal local (DFL) para eliminar o ruído de fundo existente nas imagens da camada externa da retina. Este tipo de análise permitiu eliminar todos os pixels com uma DFL inferior a uma organização vascular linear.¹⁹ Este método é menos destrutivo da morfologia original das membranas neovasculares porque seleciona os pixels de acordo com a sua organização linear, ao contrário dos filtros de imagem convencionais independentes do tipo de organização. Além deste método, utilizámos também algoritmos customizados que permitiram delinear automaticamente o contorno das membranas

neovasculares, evitando o viés de subjetividade inerente à delineação manual.³⁶

Verificámos que a proporção entre os eixos maior e menor da CNV não está associada ao tempo de tratamento. Este resultado sustenta a hipótese de que as membranas neovasculares retinianas seguem, como os neovasos tumorais, um crescimento percolar em torno de um vaso nutritivo central.^{21,22} Este padrão de crescimento permite manter a proporção entre os eixos maior e menor independentemente da área da lesão.

Encontrámos que a EMC, o número de IIVs e a densidade vascular estão associadas à duração do tratamento. Ou seja, as membranas neovasculares com maior número de tratamentos prévios são menos densas e estão associadas a uma menor esmessa macular total. Estes resultados são concordantes com trabalhos publicados que descrevem uma diminuição da densidade vascular e da EMC após o tratamento por injeções intravítreas.^{10,14,37}

Contudo, e de acordo com a nossa pesquisa bibliográfica, somos o primeiro trabalho que aplica a avaliação da dimensão fractal em pacientes com DMIn sob tratamento PRN. Constatamos que a organização das membranas neovasculares, medida pela dimensão fractal, aumenta ao longo da evolução da doença e se correlaciona de forma linear com o número de injeções intravítreas. As alterações morfológicas das membranas vasculares secundárias ao tratamento anti-VEGF foram originalmente caracterizadas em OCT-A por R. Spaide (2015). Este autor associou a atrofia dos vasos periféricos finos e arteriogénese dos vasos remanescentes à cobertura pericítica, que torna os capilares periféricos ramificados responsivos e os vasos alimentadores resistentes aos agentes anti-VEGF.^{24,38} Recentemente, Al-Sheik *et al.* (2017) estudaram a análise de dimensão fractal como um potencial biomarcador OCT-A na avaliação da atividade de membranas neovasculares. Estes autores verificaram que a DF era estatisticamente diferente entre as membranas quiescentes e as membranas ativas durante o tratamento anti-VEGF, sobretudo à custa de um aumento na organização da região central das lesões.³⁹

Os nossos resultados corroboram estas hipóteses e sugerem que a organização vascular poderá aumentar ao longo do tratamento. Contudo, o desenho do nosso trabalho não nos permite inferir a correlação com a actividade neovascular. Caberá a novos estudos avaliar se esta alteração da dimensão fractal tem uma correspondência com a actividade neovascular, permitindo adaptar os timings no follow-up dos doentes.

Com este trabalho demonstramos ainda que, com o tempo e número de tratamentos, a dimensão fractal das CNVs se aproxima da dimensão fractal dos vasos normais do plexo superficial. De acordo com a nossa pesquisa, somos o primeiro trabalho in vivo que sustenta a hipótese de R. Jain (2001) sobre a normalização dos neovasos após tratamentos anti-angiogénicos.^{23,38}

Um dos pontos fortes deste estudo está relacionado com a proporção média entre tempo de seguimento e número de IIVs, que nos permitiu estudar membranas neovasculares tratadas num regime PRN sem perdas de seguimento significativas. Além disso, os nossos resultados foram obtidos utilizando um software de acesso gratuito e imagens obtidas através de um dispositivo comercial, que nos permitiu superar a limitação de estudos OCT-A realizados com protótipos e softwares comerciais.

A principal limitação do nosso trabalho é a transversalidade da análise, caberá a futuros estudos estudar a dimensão fractal de modo longitudinal. Além disso, os critérios de inclusão relativos à qualidade das imagens diminuem a probabilidade de detetar membranas pequenas, com fluxo lento ou sob descolamentos do epitélio pigmentado fortemente vascularizados. Houve igualmente vários doentes excluídos devido à baixa qualidade de imagem, o que pode ter um efeito de viés de seleção a favor de doentes sem opacidades dos meios significativa e com uma boa fixação. Devemos também estar cientes que estes resultados resultam da análise bidimensional de estruturas tridimensionais, com todas as limitações inerentes.

Atualmente, os medicamentos mais utilizados para tratar a vascularização anómala da coróide e retina são os fármacos anti-VEGF. Com a introdução iminente de novos medicamentos que visam a remodelação vascular, os ensaios clínicos poderão vir a usar métricas baseadas em OCT-A para monitorizar a resposta ao tratamento. Enquanto isso, aguardamos por estudos prospetivos e longitudinais para avaliar a CNV com análise fractal ao longo do tratamento anti-angiogénico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bressler N. Age-Related Macular Degeneration Is the Leading Cause of Blindness... JAMA. 2004;291(15):1900-1901. doi:10.1001/jama.291.15.1900.
2. Gess AJ, Fung AE, Rodriguez JG. Imaging in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. Semin Ophthalmol.

- 2011;26(3):225-233.
doi:10.3109/08820538.2011.582533.
3. Schmidt-Erfurth U, Chong V, Loewenstein A, et al. Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *Br J Ophthalmol*. 2014;98:1144-1167. doi:10.1136/bjophthalmol-2014-305702.
4. Liakopoulos S, Ongchin S, Bansal A, et al. Quantitative optical coherence tomography findings in various subtypes of neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):5048-5054. doi:10.1167/iops.08-1877.Quantitative.
5. Munk MR, Giannakaki-zimmermann H, Berger L, et al. OCT-angiography: A qualitative and quantitative comparison of 4 OCT-A devices. *PLoS One*. 2017;12(5):ed0177059. doi:10.1371/journal.pone.0177059.
6. Inoue M, Jung JJ, Balaratnasingam C, et al. A Comparison Between Optical Coherence Tomography Angiography and Fluorescein Angiography for the Imaging of Type 1 Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:OCT314-OCT323. doi:10.1167/iops.15-18900.
7. Coscas GJ, Lupidi M, Coscas F, Cagini C, Souied EH. Optical coherence tomography angiography versus traditional multimodal imaging in assessing the activity of exudative age-related macular degeneration: a new diagnostic challenge. *Retina*. 2015;35:2219-2228.
8. Souedan V, Souied EH, Caillaux V, Miere A, Ameen A El, Blanco-Garavito R. Sensitivity and specificity of optical coherence tomography angiography (OCT-A) for detection of choroidal neovascularization in real-life practice and varying retinal expertise level. *Int Ophthalmol*. 2017;May 25. doi:10.1007/s10792-017-0559-6.
9. Liang MC, de Carlo TE, Bauman CR, et al. Correlation of Spectral Domain Optical Coherence Tomography Angiography and Clinical Activity in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Retina*. 2016;36:2265-2273. doi:10.1097/IAE.0000000000001102.
10. Carlo TE De, Filho MAB, Chin AT, et al. Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Angiography of Choroidal Neovascularization. *Ophthalmology*. 2015;122(6):1228-1238. doi:10.1016/j.optha.2015.01.029.
11. Gong J, Yu S, Gong Y, Wang F, Sun X. The Diagnostic Accuracy of Optical Coherence Tomography Angiography for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Comparison with Fundus Fluorescein Angiography. 2016;2016. doi:10.1155/2016/7521478.
12. Ichiyama Y, Sawada T, Ito Y, Kakinoki M, Ohji M. Optical Coherence Tomography Angiography Reveals Blood Flow in Choroidal Neovascular Membrane in Remission Phase of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Retina*. 2017;37(4):724-730. doi:10.1097/IAE.0000000000001576.
13. Al-Sheikh M, Iafe NA, Phasukkijwatana N, Sadda SR, Sarraf D. Biomarkers of neovascular activity in age-related macular degeneration using OCT angiography. *Retina*. 2017;May 2([Epub ahead of print]):1-11. doi:10.1097/IAE.0000000000001628.
14. Filho MAB, Carlo TEDE, Waheed NK, Duker JAYS, Sarraf D. Optical Coherence Tomography Angiography of Type 1 Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2015;160(4):739-748. doi:10.1016/j.ajo.2015.06.030.
15. Muakkassa NW, Chin AT, Carlo TDE, et al. Characterizing the effect of anti-vascular endothelial growth factor therapy on treatment-naïve choroidal neovascularization using optical coherence tomography angiography. *Retina*. 2015;35:2252-2259.
16. Kuehlewein L, Sadda SR, Sarraf D. OCT angiography and sequential quantitative analysis of type 2 neovascularization after ranibizumab therapy. *Eye (Lond)*. 2015;29(7):932-935. doi:10.1038/eye.2015.80.
17. Lindner M, Fang PP, Steinberg JS, et al. OCT Angiography – Based Detection and Quantification of the Neovascular Network in Exudative AMD. 2017. doi:10.1167/iops.16-19741.
18. Gao SS, Bailey ST, Flaxel CJ, et al. Quantification of choroidal neovascularization vessel length using optical coherence tomography angiography. *J Biomed Opt*. 2016;21(7):76010. doi:10.1117/1.JBO.21.7.076010.
19. Landini G, Murray PI, Misson GP. Local connected fractal dimensions and lacunarity analyses of 60?? fluorescein angiograms. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(13):2749-2755.
20. Masters BR. Fractal analysis of the vascular tree in the human retina. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:427-452. doi:10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140100.
21. Baish JW, Jain RK. Fractals and Cancer. *Cancer Res*. 2000;60(7):3683-3688. doi:10.1126/science.279.5347.39.
22. Gazit Y, Baish JW, Safabakhsh N, Leunig M, Baxter LT, Jain RK. Fractal characteristics of tumor vascular

- architecture during tumor growth and regression. *Microcirculation*. 1997;4:395-402.
23. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* (80-). 2005;307(5706):58-62. doi:10.1126/science.1104819.
24. Spaide RF. Optical Coherence Tomography Angiography Signs of Vascular Abnormalization With Antiangiogenic Therapy for Choroidal Neovascularization. *Am J Ophthalmol*. 2015;160(1):6-16. doi:10.1016/j.ajo.2015.04.012.
25. Freund K, Zweifel S, Engelbert M. Do We Need a New Classification for Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular. *Retina*. 2010;30:1333-1349.
26. Jung J, Chen C, Mrejen S, Al. E. The incidence of exudative subtypes in newly diagnosed exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2014;158:769-779.e762.
27. Group MPS. Subfoveal exudative lesions in age-related macular degeneration. Guidelines for evaluation and treatment in the macular photocoagulation study. *Arch Ophthalmol*. 1991;109:1242-1257.
28. Ho AC, Busbee BG, Regillo CD, et al. Twenty-four-month efficacy and safety of 0.5 mg or 2.0 mg ranibizumab in patients with subfoveal neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2014;121(11):2181-2192. doi:10.1016/j.ophtha.2014.05.009.
29. Zhang Q, Zhang A, Lee CS, et al. Projection Artifact Removal Improves Visualization and Quantitation of Macular Neovascularization Imaged by Optical Coherence Tomography Angiography. *Ophthalmology*. 2017;1(2):124-136. doi:10.1016/j.oret.2016.08.005.
30. Jia Y, Bailey ST, Wilson DJ, et al. Quantitative Optical Coherence Tomography Angiography of Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2014;121:1435-1444. doi:10.1016/j.ophtha.2014.01.034.
31. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019.
32. Otsu N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern*. 1979;9(1):62-66. doi:10.1109/TSMC.1979.4310076.
33. Karperien A. FracLac for ImageJ. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fractal/FLHelp/Introduction.htm>.
34. Parsons-Wingerter P, Lwai B, Yang MC, et al. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. *Microvasc Res*. 1998;55(3):201-214. doi:10.1006/mvre.1998.2073.
35. Tolle CR, McJunkin TR, Gorsich DJ. An efficient implementation of the gliding box lacunarity algorithm. *Phys D Nonlinear Phenom*. 2008;237(3):306-315. doi:10.1016/j.physd.2007.09.017.
36. Sezgin, Mehmet; Sankur B. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *J Electron Imaging*. 2004;13(January):146-165. doi:10.1117/1.1631316.
37. Miere A, Butori P, Cohen S. Vascular remodeling of choroidal neovascularization after anti-VEGF therapy visualized on optical coherence tomography angiography. *Retina*. 2017;(Manuscript in press).
38. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*. 2001;7(9):987-989. doi:10.1038/nm0901-987.
39. Al-sheikh M, Falavarjani KG, Tepelus TC, Sadda SR. Quantitative Comparison of Swept-Source and Spectral-Domain OCT Angiography in Healthy Eyes. 2017;48(5):385-391. doi:10.3928/23258160-20170428-04.

AGRADECIMENTOS

A todos os membros e colaboradores do Centre Ophtalmologique de l'Odeon, que participaram na realização de exames e recolha de imagens. Ao Sr. Ricardo Mendes que colaborou no grafismo do trabalho. Aos revisores anónimos que contribuíram através da leitura crítica e dos seus comentários para melhorar este trabalho.

CONTACTO

Diogo R. Cabral
Instituto de Oftalmologia Dr. Gama Pinto
Travessa Larga, nº 2
1169 Lisboa
E-mail: dgrcabral@gmail.com