

Avaliação do endotélio corneano através de microscopia especular em participantes com edema macular diabético

Corneal endothelium assessment through specular microscopy in participants with diabetic macular edema

Bárbara Sabino¹, Joana Pinto¹, Tiago Branco¹, Ricardo Batista¹, Bruno Pereira^{1,3} , Pedro Camacho^{2,3*} 

¹Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Portugal.

²H&TRC-Health & Technology Research Center, ESTeSL Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, Portugal.

³iNOVA4Health, NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, NMS, FCM, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal.

*Autor correspondente/Corresponding author: pedro.camacho@estesl.ipl.pt

Recebido/Received: 25-08-2023; Revisto/Revised: 25-03-2024; Aceite/Accepted: 28-03-2024

Resumo

Introdução: Apesar da integridade morfológica e funcional do endotélio corneano, essencial para a transparência corneana, ser afetada com a Diabetes Mellitus (DM) a sua relação com severidade de retinopatia diabética e presença de edema macular diabético não é clara. **Objetivos:** Avaliar as características morfológicas do endotélio corneano em doentes com Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) com diferentes perfis de resposta terapêutica ao edema macular diabético (EMD). **Métodos:** Com uma abordagem transversal, 24 participantes com DMT2 foram divididos em 2 grupos (sem EMD e com EMD). Posteriormente, o grupo com EMD foi subdividido de acordo o tipo de resposta terapêutica (respondedor e persistente). Parâmetros obtidos através da microscopia especular (densidade de células endoteliais, coeficiente de variação, hexagonalidade e espessura central da córnea) e da tomografia de coerência ótica (espessura mínima da fóvea, espessura no 1mm central, a espessura da camada de células ganglionares macular, e a espessura da camada de fibras nervosas peripapilar) foram analisados e comparados nos diferentes grupos. **Resultados:** Não foram encontradas alterações significativas do endotélio corneano entre os grupos com e sem EMD ($p > 0,05$). No entanto, foram encontradas diferenças na densidade de células endoteliais ($p = 0,04$) nos participantes com diferentes EMD persistente ($1900,3 \pm 270,1$) comparativamente ao EMD respondedor ($2307,9 \pm 121,2$) e grupo de controlo ($2191,7 \pm 165,5$). **Conclusão:** Os diferentes parâmetros do endotélio corneano não mostraram diferenças entre participantes com e sem EMD. No entanto, o tipo de resposta terapêutica ao EMD parece estar associada à diminuição da densidade de células endoteliais.

Palavras-chave: Endotélio corneano, Diabetes Mellitus Tipo 2, retinopatia diabética, edema macular diabético.

Abstract

Introduction: While the morphological and functional integrity of the corneal endothelium, which is essential for corneal transparency, is affected by diabetes mellitus (DM), its relationship with the severity of diabetic retinopathy and the presence of diabetic macular edema is unclear. **Aims:** To assess the morphological characteristics of the corneal endothelium in patients with Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) with different therapeutic response profiles to diabetic macular edema (DME). **Methods:** With a cross-sectional approach, 24 participants with T2DM were divided into 2 groups (without DME versus with DME). Subsequently, the group with DME was subdivided according to the type of therapeutic response (responder versus persistent). Parameters obtained through specular microscopy (endothelial cell density, coefficient of variation, hexagonality, and central corneal thickness) and optical coherence tomography (minimum foveal thickness, central 1mm thickness, macular ganglion cell layer thickness, and peripapillary retinal nerve fiber layer thickness) were analyzed and compared in the different groups. **Results:** No significant changes were found in the corneal endothelium between the groups with and without DME ($p > 0.05$). However, differences were found in the density of endothelial cells ($p = 0.04$) in participants with persistent DME (1900.3 ± 270.1) compared to participants with responding DME (2307.9 ± 121.2) and control group (2191.7 ± 165.5). **Conclusion:** There were no differences in the different parameters of the corneal endothelium between participants with and without DME. However, the kind of therapeutic response to DME seems to be associated with a decrease in endothelial cell density.

Keywords: Corneal endothelium, Type 2 Diabetes Mellitus, diabetic retinopathy, diabetic macular edema.

1. INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus (DM) é caracterizada como uma doença metabólica, de origem multifatorial, que causa o comprometimento de vários órgãos (Daryabor, Atashzar, Kabelitz, Meri, & Kalantar, 2020). Atualmente, a DM afeta cerca de 537 milhões de pessoas em todo o mundo e cerca de 61 milhões de pessoas na Europa. O crescimento da prevalência estimado até 2045 é de 13% na Europa e de 46% no resto do mundo (International Diabetes Federation, 2021), o que faz antever um aumento das complicações associadas à DM como a Retinopatia Diabética (RD) (Das, 2016).

Com uma prevalência global de 22,27% entre os doentes com diabetes, (Teo et al., 2021) a RD constitui-se como uma das complicações mais frequentes da DM, caracterizada pelo comprometimento crônico e progressivo da microvasculatura da retina (Simó-Servat, Hernández, & Simó, 2019). Com início assintomático várias alterações ocorrem como a formação de microaneurismas e aparecimento de microhemorragias, nas fases iniciais, até ao desenvolvimento de isquemia e neovascularização nas fases mais avançadas. (Wong, Cheung, Larsen, Sharma, & Simó, 2016)

Uma das principais causas de perda de visão em doentes com DM (Adams, Schechet, & Hariprasad, 2020), e que pode aparecer em qualquer fase da RD é o edema macular diabético (EMD). (Wong et al., 2016) Consequência da ação de vários fenómenos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e citocinas pró-inflamatórias, esta alteração metabólica está relacionada também com modificações ao nível do segmento anterior (Mortazavi et al., 2022).

A córnea é uma das estruturas do segmento anterior e a sua integridade é essencial para a visão humana. Neste sentido, o impacto da crescente prevalência da DM e do seu aparecimento em idades cada vez mais precoces sustenta duas preocupações. Primeiro, a disfunção celular da córnea associada à DM (Taşlı et al., 2020) (Lanza et al., 2023) na origem de algumas alterações como a queratopatia diabética. Em segundo, as alterações da integridade corneana relacionadas com DM podem, a longo prazo, comprometer a viabilidade de diferentes abordagens terapêuticas e cirúrgicas, como uso de lentes de contacto (Bussan & Robertson, 2019), cirurgia refrativa, ou cirurgia de catarata (Steinmetz et al., 2021).

Uma das estruturas essenciais na manutenção da integridade morfológica e funcional da córnea é o endotélio corneano (Mortazavi et al., 2022). Nos poucos estudos centrados no impacto da DM no segmento anterior, o coeficiente de variação do endotélio corneano foi associado à duração da doença, (Mortazavi et al., 2022) a densidade endotelial à gravidade da RD, (Taşlı et al., 2020) e outros aspetos demográficos e antropométricos também foram avaliados (Beato et al., 2020). No entanto, até ao momento, não se conhecem estudos sobre a integridade do endotélio corneano em doentes com RD e que, simultaneamente, apresentem alterações da barreira hemoretiniana que resultem em EMD (Dabir, Das, Nallathambi, Mangalesh, Yadav, & Schouten, 2014). Outro aspeto pouco claro passa por conhecer a integridade da córnea e endotélio corneano em doentes com diferentes padrões de resposta de EMD (Parravano, Costanzo, & Querques, 2020).

1. INTRODUCTION

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by a multifactorial origin, leading to impairment in several organs (Daryabor, Atashzar, Kabelitz, Meri, & Kalantar, 2020). Currently, DM affects approximately 537 million people worldwide, with around 61 million individuals affected in Europe alone. Projections suggest a 13% increase in prevalence by 2045 in Europe and a 46% increase globally (International Diabetes Federation, 2021), contributing to a rise in complications associated with DM, including Diabetic Retinopathy (DR) (Das, 2016).

With a global prevalence of 22.27% among patients with diabetes (Teo et al., 2021), DR stands as one of the most common complications of DM. It is characterized by the chronic and progressive impairment of the retinal microvasculature (Simó-Servat, Hernández, & Simó, 2019). Onset of DR is typically asymptomatic, with various changes manifesting from the formation of microaneurysms and microhemorrhages in early stages to the development of ischemia and neovascularization in advanced stages (Wong, Cheung, Larsen, Sharma, & Simó, 2016).

One of the primary causes of vision loss in patients with DM (Adams, Schechet, & Hariprasad, 2020), which can manifest at any stage of DR, is Diabetic Macular Edema (DME) (Wong et al., 2016). Resulting from various phenomena such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and pro-inflammatory cytokines, this metabolic alteration is also associated with changes in the anterior segment (Mortazavi et al., 2022).

The cornea, a vital component of the anterior segment, plays a crucial role in human vision. The increasing prevalence of DM and its onset at earlier ages raise two significant concerns. Firstly, cellular dysfunction of the cornea associated with DM (Taşlı et al., 2020) (Lanza et al., 2023) can lead to alterations such as diabetic keratopathy. Secondly, DM-related changes in corneal integrity may compromise the effectiveness of various therapeutic and surgical interventions in the long term, including the use of contact lenses (Bussan & Robertson, 2019), refractive surgery, or cataract surgery (Steinmetz et al., 2021).

The corneal endothelium is critical for maintaining the morphological and functional integrity of the cornea (Mortazavi et al., 2022). While a few studies have examined the impact of DM on the anterior segment, findings suggest associations between the coefficient of variation of the corneal endothelium and the duration of the disease (Mortazavi et al., 2022), endothelial density and the severity of DR (Taşlı et al., 2020), and other demographic and anthropometric factors (Beato et al., 2020). However, there is currently a lack of research on the integrity of the corneal endothelium in patients with DR who also exhibit alterations in the blood-retinal barrier leading to DME (Dabir, Das, Nallathambi, Mangalesh, Yadav, & Schouten, 2014). Additionally, understanding the integrity of the cornea and corneal endothelium in patients with different DME response patterns remains unclear (Parravano, Costanzo, & Querques, 2020).

Given the scarcity of data on the correlation between DR and corneal integrity, coupled with the global rise in DM across all age brackets, alongside the aging global population and its inherent multimorbidity, this study holds significant relevance.

Assim, pela escassez de informação sobre a relação entre a RD e a integridade corneana, e face ao crescimento mundial da DM em todas as faixas etárias, associado ao envelhecimento da população mundial e inerente multimorbilidade, este trabalho ganha particular interesse. Tendo em conta que o endotélio corneano sofre alterações morfológicas durante o envelhecimento, (Kaur & Gurnani, 2023), e que podem ser agravadas pela DM, este trabalho pretende avaliar as características morfológicas do endotélio corneano em doentes com DMT2 que apresentam diferentes perfis de resposta à terapêutica de primeira linha (injeção intravítrea de anti-VEGF) para o EMD. Especificamente, é avaliada a associação entre os parâmetros quantitativos da microscopia especular, como a densidade de células endoteliais, coeficiente de variação, hexagonalidade e espessura central da córnea, com o perfil de resposta terapêutica ao EMD (respondedor e persistente).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo observacional transversal foi realizado com recurso aos dados do projeto principal DiffMeDiME (IDI&CA grant IPL/ 2021/DiffMeDiME_ESTeSL), desenvolvido pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) e pelo Instituto da Retina de Lisboa (Camacho et al., 2023). Após a seleção anonimizada dos parâmetros a estudar, os dados quantitativos da microscopia especular foram consultados e recolhidos, durante o período de setembro de 2022 a abril de 2023. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e segue os princípios de Helsínquia. Todos os participantes, após leitura do consentimento livre e informado, assinaram e deram a sua autorização para a participação no estudo.

2.1. PARTICIPANTES

Após a consulta da base de dados do estudo DiffMeDiME descrito anteriormente, (Camacho et al., 2023) foi selecionada uma amostra de conveniência não probabilística de vinte e quatro participantes com exames prévios de microscopia especular. Como descrito anteriormente, (Camacho et al., 2023) a classificação da RD foi realizada de forma independente por dois especialistas de retina de acordo com a classificação de “Early Treatment Diabetic Retinopathy Study” (ETDRS) e o olho escolhido foi o que apresentava maior espessura central da retina e duração de tratamento com AVEGF. Foram recolhidos dados demográficos dos pacientes, nomeadamente a Idade, Sexo, Duração da Doença, o Tipo de DM, o Valor da Hemoglobina Glicosilada (Hb1Ac) e foram, ainda, recolhidos os valores da melhor Acuidade Visual corrigida (MAVC), com recurso à escala ETDRS.

Para a primeira parte deste estudo, os participantes diabéticos foram inicialmente divididos em 2 grupos de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos de RD. O grupo de controlo foi constituído por 11 participantes diabéticos sem RD e o grupo de estudo constituído por 13 participantes diabéticos com RD.

Para a segunda parte deste estudo, avaliar a associação entre parâmetros quantitativos da microscopia especular com o tipo de EMD (respondedor e persistente), o grupo com RD foi estratificado, de acordo com a resposta à terapêutica de primeira linha para o EMD – anti-VEGF (AVEGF). (Dabir et al., 2014;

Considering that the corneal endothelium experiences morphological alterations with age (Kaur & Gurnani, 2023), potentially exacerbated by DM, this research aims to evaluate the morphological characteristics of the corneal endothelium in patients with T2DM exhibiting varied response profiles to first-line therapy (intravitreal injection of anti-VEGF) for DME. Specifically, it seeks to analyze the association between quantitative specular microscopy parameters—such as endothelial cell density, coefficient of variation, hexagonality, and central corneal thickness—and the response profile to DME therapy (responder and persistent).

2. MATERIALS AND METHODS

This cross-sectional observational study utilized data from the DiffMeDiME main project (IDI&CA grant IPL/2021/DiffMeDiME_ESTeSL), conducted jointly by the Lisbon School of Health Technology (ESTeSL) and the Retina Institute of Lisbon (Camacho et al., 2023). Anonymized selection of parameters for analysis was performed, and quantitative specular microscopy data were collected between September 2022 and April 2023. The study received approval from the Ethics Committee and adheres to the principles outlined in the Helsinki Declaration. Prior to participation, all individuals read and signed a free and informed consent form, granting authorization to partake in the study.

2.1. PARTICIPANTS

A non-probabilistic convenience sample comprising twenty-four individuals with prior specular microscopy examinations was selected from the database of the DiffMeDiME study, as outlined previously (Camacho et al., 2023). DR classification was independently performed by two retinal specialists based on the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) criteria, with the selected eyes demonstrating the greatest central retinal thickness and duration of anti-VEGF treatment, as detailed previously (Camacho et al., 2023). Demographic information, including age, gender, duration of disease, type of diabetes mellitus (DM), glycosylated hemoglobin (HbA1c), and best-corrected visual acuity (BCVA) assessed via the ETDRS scale, was collected for each participant.

For the initial phase of the study, diabetic participants were initially categorized into two groups based on the presence or absence of clinical signs of DR. The control group comprised 11 diabetic participants without DR, while the study group included 13 diabetic participants with DR. In the subsequent phase of the study, aimed at evaluating the correlation between quantitative specular microscopy parameters and the type of DME response to first-line therapy (anti-VEGF), the DME group was stratified according to their response profile - either responders or those with persistent DME - to anti-VEGF treatment, as outlined in previous studies (Dabir et al., 2014; Gonzalez et al., 2016; Parravano et al., 2020; Pessoa et al., 2021).

The responder subgroup consisted of 7 participants with diabetes mellitus, DR and DME, with a central retinal thickness of $\geq 305 \mu\text{m}$ in women and $\geq 320 \mu\text{m}$ in men (Dabir et al., 2014). Additionally, they exhibited a reduction in central retinal thickness of more than 10% on spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT), and the study eye

Gonzalez et al., 2016; Parravano et al., 2020; Pessoa et al., 2021) O subgrupo respondedor foi constituído por 7 participantes com DM, com RD e com EMD, com uma espessura $\geq 305 \mu\text{m}$ nas mulheres e $\geq 320 \mu\text{m}$ nos homens, com redução da espessura central da retina $> 10\%$ no SD-OCT (Dabir et al., 2014) e o olho em estudo foi o olho com uma melhoria na Melhor Acuidade Visual Corrigida (MAVC) ≥ 5 letras (Parravano et al., 2020). O subgrupo não respondedor foi constituído por 6 participantes com DM, com RD e com EMD com uma de espessura $\geq 305 \mu\text{m}$ nas mulheres e $\geq 320 \mu\text{m}$ nos homens (Dabir et al., 2014), com estabilidade, agravamento ou melhoria $< 10\%$ da espessura da retina em, pelo menos, 90 dias após o tratamento ou avaliação médica e ainda uma melhoria insatisfatória da MAVC (< 5 letras).

2.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão aplicados foram: pacientes com patologias sistémicas descontroladas; outras patologias oculares que afetem a córnea e/ou retina no olho estudado; participantes com história de cirurgia ocular ou tratamento laser prévio; participantes com realização de injeção intravítrea nos 120 dias prévios à realização do exame de microscopia especular; uso de lentes de contacto; comprimento axial $> 26 \text{ mm}$; com valores de Pressão Intraocular (PIO) $> 21 \text{ mmHg}$; com altas ametropias (equivalente esférico superior a -6.00 D e $+2.00 \text{ D}$); com patologia sistémica que tenha afeção oftálmica e pacientes com historial de doença cardíaca isquémica.

2.3. CARACTERIZAÇÃO OFTALMOLÓGICA

Todos os participantes selecionados para o estudo foram sujeitos a uma observação oftalmologia completa: MAVC em escala ETDRS, retinografia digital 133° (Clarus 500, Carl Zeiss), OCT de domínio espectral (SDOCT) (Spectralis; Heidelberg Engineering, Heidelberg Alemanha) e microscopia especular Nidek CEM-530 (Nidek Co., Tóquio, Japão). Através da leitura dos registos clínicos foram obtidos os dados relativos à idade, duração do DM, e hemoglobina A1C (HbA1c) de cada participante.

A avaliação e quantificação da espessura total da retina e da camada das células ganglionares (CCG) realizou-se com base no protocolo SDOCT de varrimento de volume macular, com aquisições SD-OCT ($20^\circ \times 20^\circ$, 49 HR B-scans), com 1024 A-scans por B-scan e uma resolução de profundidade de $3,9 \mu\text{m}$.

Para a quantificação da espessura da camada de fibras nervosas (CFN) peripapilar foi utilizado o programa RNFL, que efetuou a medição através de um varrimento circular HS ($3,5 \text{ mm}$ de diâmetro), centrado no disco ótico.

A avaliação do endotélio corneado foi obtida através da utilização do microscópio especular Nidek CEM-530 (Nidek Co., Tóquio, Japão). Através desta aquisição, não invasiva e sem contato, foi feita a análise endotelial completa com o estudo central, paracentral (8 pontos) e periférica de forma automática. A estrutura do endotélio corneano foi estudada de acordo com os seguintes parâmetros: percentagem de células hexagonais, espessura central da córnea densidade de células endoteliais e coeficiente de variação. Todas as medições foram realizadas no período da manhã, entre as 10h00 e 12h00 pela mesma equipa clínica.

demonstrated a BCVA improvement of ≥ 5 letters, in line with the criteria previously outlined (Parravano et al., 2020). On the other hand, the non-responder subgroup comprised 6 participants with DM, DR, and DME, meeting the thickness criteria ($\geq 305 \mu\text{m}$ in women and $\geq 320 \mu\text{m}$ in men) as defined by Dabir (Dabir et al., 2014) These individuals demonstrated stability, worsening, or an improvement of less than 10% in retinal thickness at least 90 days after treatment or medical assessment. Furthermore, they exhibited unsatisfactory improvement in BCVA (< 5 letters).

2.2. EXCLUSION CRITERIA

The exclusion criteria applied were: patients with uncontrolled systemic pathologies; other ocular pathologies affecting the cornea and/or retina in the studied eye; participants with a history of ocular surgery or previous laser treatment; participants who had undergone intravitreal injection in the 120 days prior to the specular microscopy examination); use of contact lenses; axial length $> 26 \text{ mm}$; with Intraocular Pressure (IOP) values $> 21 \text{ mmHg}$; with high ametropias (spherical equivalent greater than -6.00 D and $+2.00 \text{ D}$); with systemic pathology that affects the eye and patients with a history of ischemic heart disease.

2.3. OPHTHALMOLOGICAL CHARACTERIZATION

All the participants selected for the study underwent a complete ophthalmological observation: ETDRS scale CVAM, 133° digital retinography (Clarus 500, Carl Zeiss), spectral domain OCT (SD OCT) (Spectralis; Heidelberg Engineering, Heidelberg Germany) and Nidek CEM-530 specular microscopy (Nidek Co., Tokyo, Japan). Data on the age, duration of DM and haemoglobin A1C (HbA1c) of each participant was obtained by reading the clinical records.

The assessment and quantification of the total thickness of the retina and ganglion cell layer (GCL) were conducted using the macular volume scan protocol of the SD-OCT. This protocol involved SD-OCT acquisitions with dimensions of $20^\circ \times 20^\circ$, consisting of 49 high-resolution (HR) B-scans. Each B-scan comprised 1024 A-scans and offered a depth resolution of $3.9 \mu\text{m}$.

Furthermore, the thickness of the peripapillary nerve fiber layer (pRNFL) was quantified using the RNFL program, employing a circular high-speed (HS) scan with a diameter of 3.5 mm centered on the optical disc.

The evaluation of the corneal endothelium was performed utilizing a Nidek CEM-530 specular microscope (Nidek Co., Tokyo, Japan). This non-invasive and non-contact acquisition facilitated a comprehensive endothelial analysis, encompassing central, paracentral (8 points), and peripheral studies automatically. Parameters such as the percentage of hexagonal cells, central corneal thickness, endothelial cell density, and coefficient of variation were examined to characterize the structure of the corneal endothelium. Consistency was maintained by conducting all measurements in the morning, specifically between 10 am and 12 pm, and performed by the same clinical team.

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi efetuada com recurso ao SPSS (SPSS Inc., IBM, Somers, NY, USA) para o Windows com a versão V.26.0

Após a análise descritiva, as variáveis qualitativas (sexo, o olho estudado e a terapêutica) foram estudadas através do teste do Qui-Quadrado. A comparação da idade média dos grupos, o valor da HbA1c, os anos de duração da doença, a melhor acuidade visual, a espessura mínima da fóvea, CCG total, CFN total e espessura da córnea foi realizada através do teste de t-Student para amostras independentes, segundo as características dos dados e após verificação da normalidade da amostra. Para as variáveis métricas que não apresentaram condições de normalidade, como o estudo da pressão intraocular e do índice de massa corporal, a hexagonalidade das células corneanas e alguns parâmetros da retina (espessura superior e inferior dos 3mm centrais, nasal e temporal dos 6mm centrais, CCG temporal 3mm, superior e nasal 6mm), foi utilizado o teste de U de Mann-Whitney.

Para o estudo de mais de duas amostras independentes (grupo de controlo, EMD não respondedor e EMD respondedor) foram utilizados os testes ANOVA e Kruskal-Wallis segundo as características das variáveis e condições de aplicabilidade. Para este estudo foram adotados um intervalo de confiança de 95% e um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Pela observação da tabela 1 verifica-se uma proximidade das diferentes características avaliadas ($p > 0,05$) nos dois grupos com exceção da HbA1c ($p = 0,007$) e da MAVC ($p < 0,001$).

2.4. STATISTICAL ANALYSIS

The statistical analysis was conducted using SPSS (SPSS Inc., IBM, Somers, NY, USA) for Windows, version V.26.0.

Following descriptive analysis, qualitative variables (gender, eye studied, and therapy) were examined using the Chi-Square test. Mean age of groups, HbA1c value, duration of disease in years, best visual acuity, minimum foveal thickness, total GCL, total RNFL, and corneal thickness were compared using Student's t-test for independent samples, contingent upon data characteristics and subsequent confirmation of normality in the sample. For metric variables that were not normally distributed, such as intraocular pressure, body mass index, corneal cell hexagonality, and certain retinal parameters (superior and inferior thickness of the central 3mm, nasal and temporal thickness of the central 6mm, temporal GCL 3mm, superior and nasal 6mm), the Mann-Whitney U-test was applied.

For the study of more than two independent samples (control group, DME non-responders and DME responders), ANOVA and Kruskal-Wallis tests were used according to the characteristics of the variables and conditions of applicability. A 95% confidence interval and a 5% significance level were adopted for this study.

3. RESULTS

Table 1 shows that the different characteristics assessed were similar ($p > 0,05$) in both groups, with the exception of HbA1c ($p = 0,007$) and BCVA ($p < 0,001$).

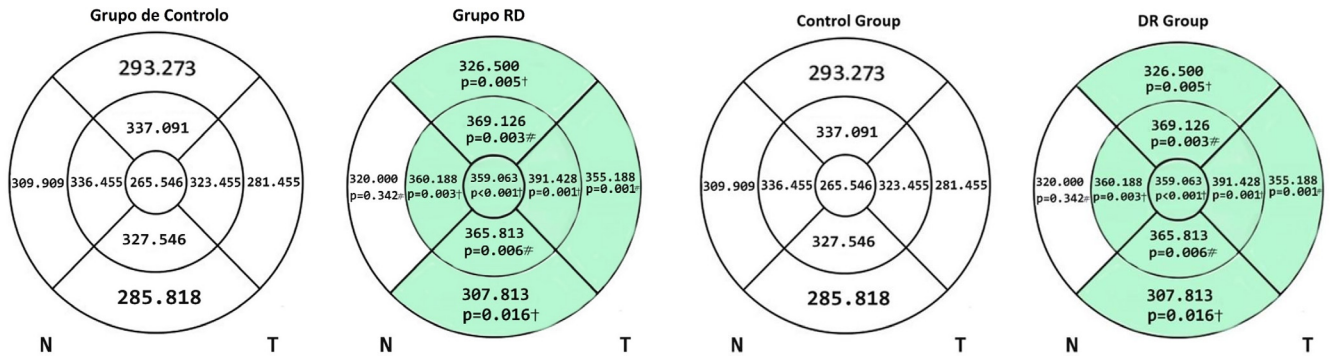
Tabela/Table 1: Características principais do grupo de controlo e do grupo com Retinopatia Diabética (RD)/Main characteristics of the control group and the Diabetic Retinopathy (DR) group.

Dados/ Clinical characteristics	Grupo de Control on=11/ Control Group n=11	Grupo RD n=13/ DR Group n=13	Valor-p/ p-value
Idade, anos (média±DP)/ Age, years (mean±SD)	74,3 ± 2,0	70,5 ± 2,2	0,146 [†]
Sexo, feminino (%)/Sex, female (%)	5 (45,5%)	10 (62,5%)	0,452 [‡]
HbA1c (média±DP)/HbA1c (mean±SD)	7,3 ± 0,2	8,6 ± 0,5	0,007 [†]
Duração da Doença, anos (média±SD)/ DM duration, years (mean±SD)	18,7 ± 1,7	23,0 ± 3,0	0,345 [†]
MAVC, letras (média±DP)/ BCVA, letters (mean±SD)	81,9 ± 0,8	64,6 ± 3,7	<0,001 [†]
PIO, mmHg (média±DP)/ IOP, mmHg (mean±SD)	14,6 ± 0,2	15,8 ± 0,6	0,110 [#]
Olho estudado (OD/OE) (n)/ Study eye (OD/OE) (n)	6 (54,5%):5 (45,5%)	7 (53,8%):9 (64,3%)	0,704 [‡]
IMC (média±DP)/BMI (mean±SD)	27,8 ± 1,1	30,6 ± 1,3	0,150 [#]
Terapêutica Dieta/Diet therapy	1 (100%)	0 (0%)	n/a
Terapêutica ADO/OAD therapy	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
Terapêutica ADO + Insulina/ OAD + insulin therapy	3 (33,3%)	6 (66,7%)	
Terapêutica Insulina/Insulin therapy	0 (0%)	6 (100%)	

Legenda/Legend: ADO = Antidiabético Oral; HbA1c = Hemoglobina Glicosilada; IMC = Índice de Massa Corporal; MAVC = Melhor Acuidade Visual Corrigida; OD = Olho Direito; OE = Olho Esquerdo; PIO = Pressão Intraocular; n/a= não aplicável; † Independent samples t-test; ‡ Chi-squared test; # Independent samples U- test of Mann-Whitney/OAD = Oral Antidiabetic; HbA1c = Glycosylated Haemoglobin; BMI = Body Mass Index; BCVA = Best Corrected Visual Acuity; OD = Right Eye; OE = Left Eye; IOP = Intraocular Pressure; n/a= not applicable; † Independent samples t-test; ‡ Chi-squared test; # Independent samples U- test of Mann-Whitney

Na figura 1 observa-se um aumento generalizado da espessura da retina em quase todos os sectores da grelha ETDRS do grupo com RD comparativamente ao grupo de controlo ($p < 0,05$).

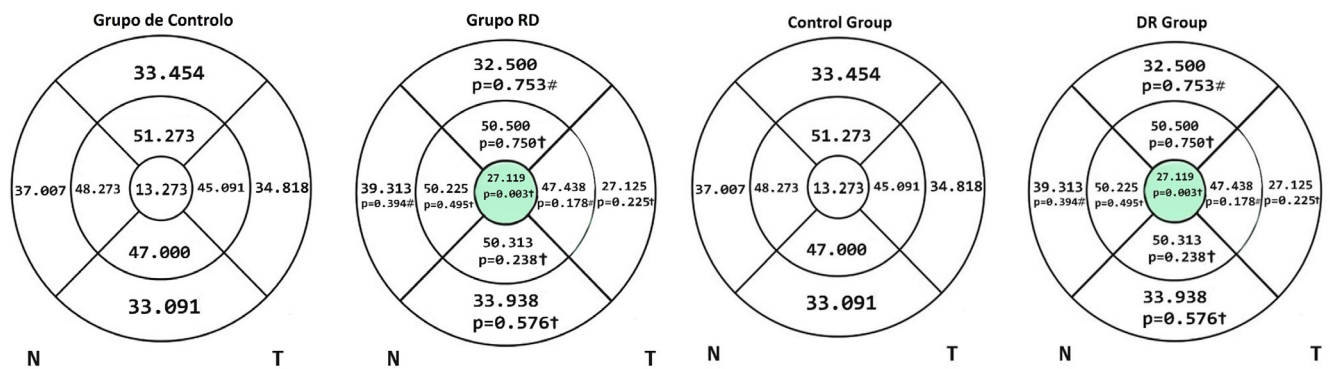
Figure 1 shows a generalized increase in retinal thickness in almost all sectors of the ETDRS grid in the DR group compared to the control group ($p < 0.05$).



Figura/Figure 1: Caracterização da espessura média da retina nos diferentes quadrantes do grupo de controlo e do grupo com Retinopatia Diabética (RD)/Characterization of the mean retinal thickness in the different quadrants of the control group and the Diabetic Retinopathy (DR) group
Legenda/Legend: † Independent samples t-test; #Independent samples U- test of Mann-Whitney.

Na Figura 2 observa-se um aumento da espessura da camada das células ganglionares no círculo central ETDRS do grupo com RD comparativamente ao grupo de controlo ($p = 0.003$).

Figure 2 shows an increase in the thickness of the ganglion cell layer in the central ETDRS circle in the DR group compared to the control group ($p = 0.003$).



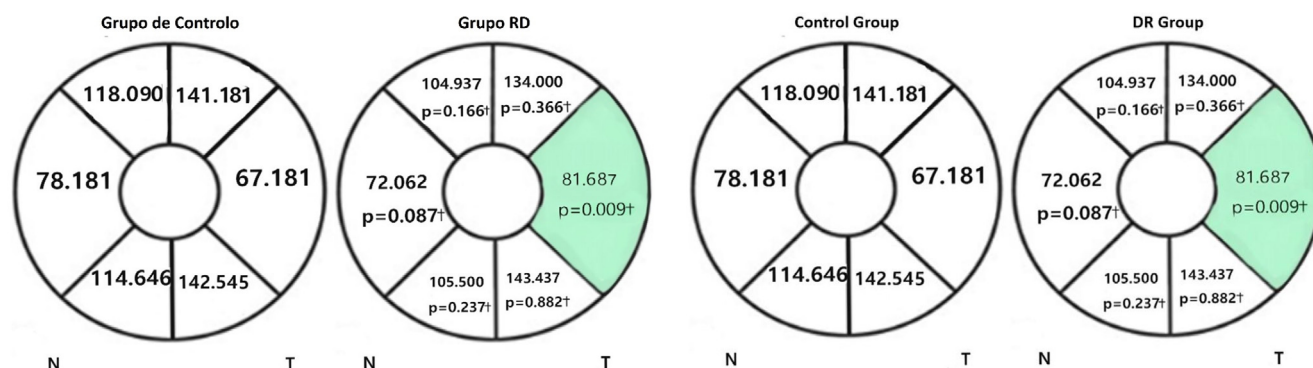
Figura/Figure 2: Comparação da espessura média das CCG nos diferentes quadrantes entre o grupo de controlo e o grupo com Retinopatia Diabética (RD)/Comparison of mean GCL thickness in the different quadrants between the control group and the Diabetic Retinopathy (DR) group.
Legenda/Legend: † Independent samples t-test; #Independent samples U- test of Mann-Whitney.

Na Figura 3 é possível verificar um aumento da espessura da CFN na região temporal ($p = 0,009$) do grupo com RD (81,6 µm) comparativamente o grupo de controlo (67,1µm). De forma oposta, embora sem diferenças estatísticas, verifica-se uma diminuição de espessura em quase todos os restantes sectores estudados.

Figure 3 shows an increase in RNFL thickness in the temporal region ($p = 0.009$) in the DR group (81.6 µm) compared to the control group (67.1 µm). Conversely, although without statistical differences, there was a decrease in thickness in almost all the other sectors studied.

Os diferentes parâmetros obtidos através da microscopia especular e tomografia de coerência ótica são apresentados na Tabela 2. É possível observar um aumento ($p = 0.001$) da espessura mínima da fóvea do grupo com RD ($299,5 \pm 17,5$ µm) em relação ao grupo de controlo ($216,2 \pm 5,2$ µm). Todos os valores obtidos nas medições da retina, CCG e CFN estão detalhados no [material suplementar 1](#). Em relação à avaliação endotelial da córnea, através da microscopia especular, verifica-se uma diminuição de todos os parâmetros no grupo com RD embora sem diferenças estatísticas.

The different parameters obtained through specular microscopy and optical coherence tomography are shown in Table 2. It is possible to observe an increase ($p = 0.001$) in the minimum thickness of the fovea of the group with DR (299.5 ± 17.5 µm) compared to the control group (216.2 ± 5.2 µm). All the values obtained in the measurements of the retina, CCG and RNFL are detailed in [supplementary material 1](#). Regarding the corneal endothelial assessment, using specular microscopy, there was a decrease in all the parameters in the group with RD, although without statistical differences.



Figura/Figure 3: Comparação da espessura média das CFN nos diferentes quadrantes entre grupo de controlo e grupo com RD/Comparison of the mean thickness of the RNFL in the different quadrants between the control group and the Diabetic Retinopathy (DR) group.

Legenda/Legend: † Independent samples t-test.

Tabela/Table 2: Descrição dos principais parâmetros quantitativos do segmento anterior e posterior nos doentes sem e com RD/Description of the main quantitative parameters of the anterior and posterior segments in patients without and with DME.

Dados/ Quantitative parameters	Grupo de Controlo n=11/ Control Group n=11	Grupo RD n= 13/ DR Group n= 13	Valor-p/p-value
Espessura mínima da fóvea, µm (média±DP)/ Minimum fovea thickness, µm (mean±SD)	216,2 ± 5,2	299,5 ± 17,5	0,001†
Espessura CCG total, µm (média±DP)/ Total GCL thickness, µm (mean±SD)	38,1 ± 0,9	40,9 ± 1,3	0,111†
Espessura CFN total, µm (média±DP)/ Total RNFL thickness, µm (mean±SD)	103,5 ± 3,1	99,9 ± 2,4	0,296†
Espessura Coroide, µm (média±DP)/ Choroid thickness, µm (mean±SD)	268,2 ± 36,2	246,9 ± 19,3	0,200 †
Densidade Endotelial, cd/mm2 (média±DP)/ Endothelial density, cd/mm2 (mean±SD)	2191,7 ± 165,5	2124,8 ± 118,9	0,739†
Coefficiente de Variação (média±DP)/ Coefficient of Variation (mean±SD)	32,5 ± 2,6	31,9 ± 1,4	0,833†
Hexagonalidade (média±DP)/ Hexagonality (mean±SD)	66,2 ± 2,0	65,7 ± 2,4	0,680 #
Espessura da córnea, µm (média±DP)/ Corneal thickness, µm (mean±SD)	560,4 ± 8,1	564,4 ± 12,5	0,811†

Legenda/Legend: CCG = Camada de Células Ganglionares; CFN = Camada de Fibras Nervosas; DP= desvio padrão † Independent samples t-test; † Normality Test Kolmogorov-Smirnov; # Independent samples U- test of Mann-Whitney/GCL = Ganglion Cell Layer; RNFL = Retinal Nerve Fiber Layer; SD=standard deviation † Independent samples t-test; † Normality Test Kolmogorov-Smirnov; # Independent samples U- test of Mann-Whitney.

Após a estratificação dos grupos em função do tipo de EMD (respondedor ou persistente) é possível verificar alguns achados importantes apresentados na Tabela 3. Verifica-se que o grupo com EMD persistente apresenta valores de MAVC inferiores (58,3 ± 6,6 letras) aos apresentados pelo grupo de controlo (81,9 ± 0,8 letras) e mesmo pelo grupo com EMD respondedor (p < 0.001). Sem diferenças estatísticas em relação ao controlo metabólico (HbA1c) o grupo com EMD persistente caracteriza-se por um IMC superior (p=0,006) ao do grupo de controlo (32,3 ± 2,3 µm; 27,8 ± 0,2 µm). Na quantificação da espessura da retina total, o grupo com EMD persistente apresenta valores de espessura no 1 mm central superiores (p<0,001) aos apresentados pelo grupo de controlo e grupo de EMD respondedor (405,0 ± 53,9 µm; 265,5 ± 16,9 µm; 323,4 ± 70,2 µm). Em relação às camadas internas neurais, o grupo com EMD persistente apresenta valores superiores (p=0,013) da espessura de CCG (43,9 ± 4,5 µm) comparativamente ao grupo de controlo (38,1 ± 3,1 µm) e com EMD respondedor (38,7 ± 4,3 µm). Padrão semelhante de aumento de espessura (p=0,009) é encontrado na CFN temporal no grupo com EMD

After stratifying the groups according to the type of DME (responder or persistent), important findings are presented in Table 3. The group with persistent DME exhibited lower BCVA values (58.3 ± 6.6 letters) compared to both the control group (81.9 ± 0.8 letters) and the responder DME group (p < 0.001). Despite no statistical differences in metabolic control (HbA1c), the persistent DME group had a higher body mass index (BMI) (p=0.006) than the control group (32.3 ± 2.3 µm; 27.8 ± 0.2 µm). Regarding the total retinal thickness, the persistent DME group showed thicker values in the central 1 mm (p<0.001) compared to both the control and responder DME groups (405.0 ± 53.9 µm; 265.5 ± 16.9 µm; 323.4 ± 70.2 µm). Additionally, concerning the internal neural layers, the persistent DME group exhibited higher thickness values (p=0.013) for the GCL (43.9 ± 4.5 µm) compared to the control group (38.1 ± 3.1 µm) and the responder DME group (38.7 ± 4.3 µm). A similar pattern of increased thickness (p=0.009) is observed in the temporal RNFL in the persistent DME group (81.7 ± 3.9 µm) compared to the responder DME group (67.2 ± 2.1 µm). When evaluating corneal structure and morphology, stratified by DME response

persistente ($81,7 \pm 3,9 \mu\text{m}$) comparativamente ao grupo com EMD respondedor ($67,2 \pm 2,1 \mu\text{m}$). Na avaliação da estrutura e morfologia da córnea, ao realizar esta estratificação pelo perfil de resposta do EMD, é possível verificar que o grupo com EMD persistente apresenta valores de Densidade endotelial ($1900,3 \pm 270,1 \mu\text{m}$) inferiores ($p = 0.040$) aos apresentados pelo grupo de controlo ($2191,7 \pm 165,5 \mu\text{m}$) e pelo grupo de EMD respondedor ($2307,9 \pm 121,2 \mu\text{m}$).

profile, it is evident that the persistent DME group exhibits lower endothelial density values ($1900.3 \pm 270.1 \mu\text{m}$) ($p = 0.040$) compared to both the control group ($2191.7 \pm 165.5 \mu\text{m}$) and the responder DME group ($2307.9 \pm 121.2 \mu\text{m}$).

Tabela/Table 3: Características Gerais do grupo controlo, com EMD respondedor e com EMD persistente/General characteristics of patients without DME, with responding DME, and with persistent DME.

Dados/ Quantitative parameters	Grupo de Controlon = 11/ Control Group n= 11	Grupo com EMD respondedor n= 7 Responder DME n= 7	Grupo com EMD persistente n= 6/ Persistent DME n= 6	Valor-p/p-value
Idade anos (média±DP)/ Age years (mean±SD)	74,3 ± 2,0	70,0 ± 2,3	71,2 ± 4,1	0,355 [†]
MAVC/BCVA	81,9 ± 0,8	70,0 ± 3,3	58,3 ± 6,6	<0,001 [†]
Olho estudado (OD/OE) (n)/ Study eye (OD/OE) (n)	6:5	3:6	4:3	
HbA1c (média±DP)/ HbA1c (mean±SD)	7,3 ± 0,2	8,1 ± 0,3	9,2 ± 0,8	0,200 ^h
IMC (média±DP)/ BMI (mean±SD)	27,8 ± 1,1	29,2 ± 1,4	32,3 ± 2,3	0,006 ^h
Espessura mínima fóvea, μm (média±DP)/Minimum foveal thickness, μm (mean±SD)	216,2 ± 5,2	263,6 ± 27,4	342,7 ± 23,6	0,200 ^h
Espessura 1mm central, μm (média±DP)/ Central 1mm thickness, μm (mean±SD)	265,5 ± 16,9	323,4 ± 70,2	405,0 ± 53,9	<0,001 [†]
Espessura CCG total, μm (média±DP)/Total GCL thickness, μm (mean±SD)	38,1 ± 3,1	38,7 ± 4,3	43,9 ± 4,5	0,013 [†]
Espessura CFN total, μm (média±DP)/Total RNFL thickness, μm (mean±SD)	103,5 ± 10,3	97,8 ± 10,7	101,3 ± 8,4	0,461 [‡]
Densidade Endotelial, cd/ mm ² (média±DP)/Endothelial density, cd/mm ² (mean±SD)	2191,7 ± 165,5	2307,9 ± 121,2	1900,3 ± 270,1	0,040 ^l
Coefficiente de Variação (média±DP)/Coefficient of Variation (mean±SD)	32,5 ± 2,6	32,4 ± 2,3	30,8 ± 2,5	0,975 [†]
Hexagonalidade (média±DP)/ Hexagonality (mean±SD)	66,2 ± 2,0	62,0 ± 4,8	69,3 ± 2,6	0,692 [†]
Espessura da córnea, μm (média±DP)/Corneal thickness, μm (mean±SD)	560,4 ± 8,1	564,4 ± 16,0	543,7 ± 14,6	0,570 [†]

Legenda/Legend: CCG = Camada de Células Ganglionares; CFN = Camada de Fibras Nervosas; HbA1c = Hemoglobina Glicosilada; IMC = Índice de Massa Corporal; MAVC = Melhor Acuidade Visual Corrigida; OD = Olho Direito; OE = Olho Esquerdo; DP= desvio padrão; ‡ ANOVA; † Normality Test Kolmogorov-Smirnov; † Post-Hoc Test; † Independent samples Kruskal-Wallis Test/GCL = Ganglion Cell Layer; RNFL = Retinal Nerve Fiber Layer; SD=standard deviation † Independent samples t-test; † Normality Test Kolmogorov-Smirnov; # Independent samples U- test of Mann-Whitney.

A correlação das principais variáveis (doença, SDOCT e microscopia) estudadas neste trabalho, e ajustadas à idade, está apresentada na tabela 4. A duração da doença apresenta uma correlação negativa com a DCE (-0,545; $p = 0,007$). O IMC apresenta uma correlação positiva com a hexagonalidade (0,435; $p = 0,038$).

Em relação à espessura da retina, a espessura na região do 1mm central apresenta uma correlação positiva com a CCG (0,574; $p = 0,004$) e uma correlação negativa com a DCE (-0,462; $p = 0,027$). Ao nível das camadas internas, a CCG apresenta uma correlação negativa com a DCE (-0,460; $p = 0,027$).

The correlation of the primary variables (disease, SD OCT, and microscopy) investigated in this study, adjusted for age, is presented in Table 4. Disease duration exhibits a negative correlation with Endothelial Cell Density (-0.545; $p = 0.007$). Body mass index (BMI) demonstrates a positive correlation with corneal hexagonality (0.435; $p = 0.038$).

Regarding retinal thickness, the thickness in the central 1mm displays a positive correlation with ganglion cell complex (GCL) (0.574; $p = 0.004$) and a negative correlation with endothelial cell density (ECD) (-0.462; $p = 0.027$). Within the internal retinal layers, GCL exhibits a negative correlation with Endothelial Cell Density (-0.460; $p = 0.027$).

Tabela/Table 4: Matriz de correlação de Spearman das principais variáveis (doença, SDOCT e microscopia) ajustadas à idade/Spearman correlation matrix of the primary variables (disease, SD OCT, and microscopy) adjusted for age.

Variáveis Controle		DD	IMC/BMI	Retina 1mm	CCG Total	DCE/ECD	CV	Hex
DD	C	1.000	-.041	.322	.107	-.545	-.291	.098
	Valor-p/p-value	.	.852 [§]	.135 [§]	.627 [§]	.007 [§]	.178 [§]	.656 [§]
IMC/BMI	C	-	1.000	.243	.390	-.095	-.102	.435
	Valor-p/p-value	-	.	.265 [§]	.066 [§]	.665 [§]	.642 [§]	.038 [§]
Retina 1mm	C	-	-	1.000	.574	-.462	-.121	.090
	Valor-p/p-value	-	-	.	.004 [§]	.027 [§]	.581 [§]	.684 [§]
CCG Total	C	-	-	-	1.000	-.460	-.153	.294
	Valor-p/p-value	-	-	-	.	.027 [§]	.485 [§]	.174 [§]
DCE/ECD	C	-	-	-	-	1.000	.359	-.305
	Valor-p/p-value	-	-	-	-	.	.093 [§]	.156 [§]
CV	C	-	-	-	-	-	1.000	-.163
	Valor-p/p-value	-	-	-	-	-	.	.456 [§]
Hex	C	-	-	-	-	-	-	1.000
	Valor-p/p-value	-	-	-	-	-	-	.

Legenda/Legend: Correlação parcial ajustada à idade; CV = Coeficiente de Variação; DCE = Densidade de Células do Endotélio; DD = Duração da Doença; E, Retina 1mm = Espessura da Retina nos 1mm centrais; E, CCG Total = Espessura Total da Camada de Células Ganglionares; Hex = Hexagonalidade; IMC = Índice de Massa Corporal; § - Coeficiente de Correlação de Person; Verde – Correlação Positiva; Vermelho – Correlação Negativa/C = Age-adjusted partial correlation; CV = Coefficient of Variation; ECD = Endothelial Cell Density; DD = Disease Duration; E, Retina 1mm = Retinal Thickness in the central 1mm; E, Total GCL = Total Ganglion Cell Layer Thickness; Hex = Hexagonality; BMI = Body Mass Index; § - Person's Correlation Coefficient; Green - Positive Correlation; Red - Negative Correlation.

4. DISCUSSÃO

A utilização do SD-OCT e da microscopia especular, apesar do tempo necessário para a análise e interpretação dos dados que fornecem, possibilita claras melhorias na monitorização da evolução da patologia ao nível da retina e da córnea respetivamente.

Os resultados deste estudo demonstram que, mesmo sem significado estatístico, verifica-se uma diminuição ligeira da densidade e número de células endoteliais, quantificadas através de microscopia especular, em doentes com RD comparativamente a doentes diabéticos sem RD. De forma mais detalhada e, ao estratificar os participantes com RD pelo perfil de resposta terapêutica ao EMD, observa-se uma diminuição significativa da densidade endotelial (p=0,04) no grupo com EMD persistente comparativamente aos grupos de controlo e com EMD respondedor.

É reconhecida a importância do controlo metabólico e da duração da doença no desenvolvimento e severidade da RD. No entanto, o impacto do controlo metabólico na estrutura e integridade da córnea é pouco claro (Beato et al., 2020), apesar da clara relevância da integridade do endotélio na programação de cirurgias oculares (Jha, Verma, & Alagorie, 2022) (Chen et al., 2021). Apesar de valores elevados de HbA1c (≥ 6.8%) aumentarem a probabilidade de desenvolver RD, (Matsushita et al., 2020) estes são insuficientes para explicar a progressão da RD (Marques et al., 2020) e mecanismos fisiopatológicos semelhantes podem estar envolvidos na perda de células do endotélio (Balasopoulou et al., 2017) como a acumulação de produtos finais de glicação e fatores de stress oxidativo.

Na Tabela 3 apesar do grupo com EMD persistente apresentar pior MAVC (p<0,001) e maiores valores de espessura de retina (p<0,001), que de forma expectável traduzem o impacto da acumulação de líquido intra/subretiniano (Prager

4. DISCUSSION

The use of SD-OCT and specular microscopy, while demanding in terms of time for data analysis and interpretation, offers significant enhancements in monitoring the progression of retinal and corneal pathologies, respectively.

The findings of this study, even without statistical significance, reveal a subtle reduction in endothelial cell density and number, as assessed by specular microscopy, among patients with DR compared to those without DR. Upon further stratification of DR participants based on DME therapeutic response, a notable decrease in endothelial density (p=0.04) is observed in the persistent DME group when compared to both the control and responding DME groups.

The importance of metabolic control and disease duration in the development and severity of DR is well recognized. However, the impact of metabolic control on the structure and integrity of the cornea remains unclear (Beato et al., 2020), despite the evident relevance of endothelial integrity in the scheduling of eye surgeries (Jha, Verma, & Alagorie, 2022) (Chen et al., 2021). Although high HbA1c values (≥ 6.8%) increase the likelihood of developing DR (Matsushita et al., 2020), they are insufficient to fully explain the progression of the condition (Marques et al., 2020). Similar pathophysiological mechanisms, (Balasopoulou et al., 2017) such as the accumulation of glycation end products and oxidative stress factors, may be involved in the loss of endothelial cells.

In Table 3, although the group with persistent DME had worse BCVA (p<0.001) and greater retinal thickness values (p<0.001), which can be expected to reflect the impact of intra/subretinal fluid accumulation (Prager et al., 2018), no significant differences were found in Hb1Ac (p=0.200). However, even with similar metabolic control profiles, changes in endothelial density were found in the group with persistent DME, reinforcing the

et al., 2018), não foram encontradas diferenças significativas na Hb1Ac ($p=0,200$). No entanto, mesmo com semelhantes perfis de controlo metabólico, foram encontradas alterações na densidade endotelial no grupo com EMD persistente reforçando a possível importância do estudo desta estrutura.

Apesar de escassos, os estudos sobre o impacto da DM na córnea sugerem uma diminuição na hexagonalidade e na densidade de células (Goldstein, Janson, Skeie, Ling, & Greiner, 2020). Em abordagem análoga que dividiu participantes diabéticos em três grupos (sem RD, com RD não proliferativa e com RD proliferativa) foram descritas também alterações do endotélio corneano e da espessura central da córnea segundo a severidade da RD. (El-Agamy & Alsubaie, 2017). Mais recentemente, a associação entre a severidade da RD e as alterações do endotélio corneano foi novamente descrita com maior evidência nos casos de RD mais severos. (Durukan, 2020)

Os dados apresentados neste trabalho além de suportarem semelhantes achados ao nível da densidade endotelial demonstram que mesmo em doentes com RD ligeira/moderada, com perfis metabólicos e de duração de doença semelhante, mas com EMD já são observadas alterações mensuráveis do endotélio corneano.

Além das possíveis modificações do endotélio corneano na presença de DM, (Zheng, Le, Hong, & Xu, 2016) a idade é um importante fator a considerar e as alterações ao longo da idade conhecidas (Goldstein et al., 2020). Em relação à idade, estes dados aqui apresentados reforçam que mesmo com idades mais avançadas, mas com ausência de RD, a densidade endotelial é superior. No processo de normal envelhecimento humano há uma diminuição da densidade celular (DCE), acompanhada de uma diminuição da espessura corneana e da alteração da morfologia das células do endotélio, nomeadamente fenómenos de polimegatismo e pleomorfismo (Kaur & Gurnani, 2023). Neste estudo, é de referir que, apesar dos grupos com EMD (respondedor e persistente) representarem amostras mais jovens comparativamente com a do grupo de controlo, observou-se uma tendência para estes grupos apresentarem valores menores, quando comparados com os valores do grupo de controlo que é mais envelhecido. Mesmo entre os grupos com EMD, o grupo com EMD respondedor é mais envelhecido do que o grupo com EMD persistente reforçando o padrão acima referido.

De forma a clarificar possíveis correlações entre as variáveis estudadas, mas ajustando o fator idade, verificou-se que com a duração da DM há uma diminuição do nº de células e da DCE (Shenoy, Khandekar, Bialasiewicz, & Al Muniri, 2009); o aumento da espessura da retina no 1mm central, que traduz a severidade do EMD, correlaciona-se negativamente com a DCE. Um aspeto curioso podendo traduzir fenómenos de neurodegeneração associados à DM (Gasecka et al., 2020)(Mortazavi et al., 2022) foi a correlação negativa encontrada entre a CCG e a DCE compreensivelmente associada à presença de acumulação de líquido intraretiniano de forma persistente.

Apesar das diferenças clínicas encontradas na análise inicial dos principais parâmetros do segmento anterior e posterior nos doentes sem e com EMD, foi com a estratificação dos participantes de acordo com o perfil de resposta terapêutica ao EMD que se tornaram mais evidentes as alterações ao nível

possível importância de estudar esta estrutura.

Recent studies have shed light on the impact of DM on the cornea, indicating a reduction in hexagonality and cell density (Goldstein, Janson, Skeie, Ling, & Greiner, 2020). Similarly, an analogous investigation categorizing diabetic participants into three groups - without DR, with non-proliferative DR, and with proliferative DR - revealed alterations in the corneal endothelium and central corneal thickness correlating with the severity of DR (El-Agamy & Alsubaie, 2017). Moreover, a more recent study has reaffirmed the correlation between the severity of DR and changes in the corneal endothelium, particularly noting pronounced alterations in cases of severe DR (Durukan, 2020). The findings presented in this study not only corroborate previous discoveries regarding endothelial density but also indicate that measurable changes in the corneal endothelium are evident even in patients with mild/moderate DR and DME, despite similar metabolic profiles and disease duration.

In addition to potential alterations in the corneal endothelium due to DM (Zheng, Le, Hong, & Xu, 2016), age is a crucial factor to consider, given its known changes over time (Goldstein et al., 2020). Regarding age, the data presented here underscore that even in older individuals without DR, endothelial density tends to be higher. With advancing age, there is typically a decline in endothelial cell density (ECD), concomitant with reductions in corneal thickness and alterations in endothelial cell morphology, including phenomena such as polymegathism and pleomorphism (Kaur & Gurnani, 2023). It is noteworthy that in this study, despite the responder and persistent DME groups comprising younger samples compared to the control group, there was a tendency for these groups to exhibit lower values of endothelial density compared to the older control group. Additionally, within the DME groups, the responder DME group tended to be older than the persistent DME group, further confirming the observed pattern.

To elucidate potential correlations between the studied variables while adjusting for the age factor, it has been observed that the duration of DM is associated with a reduction in endothelial cell count (ECC) and ECD (Shenoy, Khandekar, Bialasiewicz, & Al Muniri, 2009). Additionally, the increase in retinal thickness within the central 1mm, indicative of the severity of DME, exhibits a negative correlation with ECD. An intriguing observation that may reflect phenomena of neurodegeneration linked to DM is the negative correlation identified between GCL thickness and ECD. This association can be attributed to the presence of persistent intraretinal fluid accumulation (Gasecka et al., 2020)(Mortazavi et al., 2022).

Despite the clinical disparities initially observed in the primary anterior and posterior segment parameters between patients with and without DME, further stratification based on therapeutic response profiles has revealed more pronounced retinal changes (Chai, Yao, Guo, Lu, & Ma, 2022), an association with increased BMI (Gurung et al., 2023), and a significant decrease ($p=0.004$) in ECD (Durukan, 2020). However, it is important to acknowledge several limitations in this study that warrant exploration in future research endeavors. It will be crucial to elucidate the potential influence of diabetes medication, standardize the frequency of intravitreal injections, which may vary among DME subgroups (Qi et al., 2023) and

da retina, (Chai, Yao, Guo, Lu, & Ma, 2022) ao aumento do IMC (Gurung et al., 2023), e a diminuição significativa ($p=0,004$) da densidade endotelial (Durukan, 2020). No entanto este trabalho tem algumas limitações que de futuro importa explorar. Será importante clarificar a possível influência da medicação utilizada para a DM, uniformizar o número de injeções intravítreas que podem diferir entre os subgrupos com EMD (Qi et al., 2023) e aumentar a dimensão da amostra.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho além de suportar clinicamente dados anteriores sobre a importância do estudo do endotélio corneano na RD severa demonstrou que existem modificações quantificáveis do endotélio corneano mesmo em doentes com RD ligeira/moderada e com perfis metabólicos e de duração de doença semelhante.

Estes achados reforçam a necessidade do estudo do endotélio corneano em doentes com DM clarificando possíveis disfunções celulares da córnea com comprometimento de diferentes abordagens terapêuticas e cirúrgicas, como uso de lentes de contacto, realização de cirurgia refrativa, ou cirurgia de catarata.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não têm quaisquer conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Este projeto foi parcialmente apoiado pela IDI&CA garantido IPL/ 2021/DiffMeDiME_ESTeSL pela H&TRC- Health & Technology Research Center, ESTeSL- Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa e pelo Instituto da Retina de Lisboa (IRL).

CONTRIBUIÇÕES AUTORAIS

Conceptualização, BS, JP, TB e PC; metodologia, BS, JP, TB, RB, BP e PC.; análise formal, BS, JP, TB, RB, BP e PC.; investigação, BS, JP, TB, BP e PC.; redação - preparação do draft original, BS, JP, TB e PC; supervisão, RB, BP e PC; coordenação do projeto, PC. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- Adams, O. E., Schechet, S. A., & Hariprasad, S. M. Discontinuous to continuous therapy for persistent diabetic macular edema leads to reduction in treatment frequency. *European Journal of Ophthalmology*, 2020. doi:10.1177/1120672120901691.
- Balaspoulou, A., Kokkinos, P., Pagoulatos, D., Plotas, P., Makri, O. E., Georgakopoulos, C. D., et al. Symposium Recent advances and challenges in the management of retinoblastoma Globe - saving Treatments. *BMC Ophthalmology*, 17(1): 1, 2017.
- Beato, J. N., Esteves-Leandro, J., Reis, D., Falcão, M., Rosas, V., Carneiro, Â., et al. Evaluation of corneal structure and endothelial morphological characteristics in type 2 diabetic and non-diabetic patients. *Clinical Ophthalmology*, 14: 1993–1999, 2020.
- Bussan, K. A., & Robertson, D. M. Contact lens wear and the diabetic corneal epithelium: A happy or disastrous marriage? *Journal of Diabetes and its Complications*, 33(1): 75–83, 2019.
- Camacho, P., Ribeiro, E., Pereira, B., Varandas, T., Nascimento, J., Henriques, J., et al. DNA methyltransferase expression (DNMT1, DNMT3a and DNMT3b) as a potential biomarker for anti-VEGF diabetic macular edema response. *European Journal of Ophthalmology*, 2023. doi:112067212311716.
- Chai, Q., Yao, Y., Guo, C., Lu, H., & Ma, J. Structural and functional retinal changes in patients with type 2 diabetes without diabetic retinopathy. *Annals of Medicine*, 54(1): 1816–1825, 2022.
- Chen, H. C., Huang, C. W., Yeh, L. K., Hsiao, F. C., Hsueh, Y. J., Meir, Y. J. J., et al. Accelerated corneal endothelial cell loss after phacoemulsification in patients with mildly low endothelial cell density. *Journal of Clinical Medicine*, 10(11): 1–10, 2021.
- Dabir, S. S., Das, D., Nallathambi, J., Mangalesh, S., Yadav, N. K., & Schouten, J. S. A. G. Differential systemic gene expression profile in patients with diabetic macular edema: Responders versus nonresponders to standard treatment. *Indian Journal of Ophthalmology*, 62(1): 66–73, 2014.
- Daryabor, G., Atashzar, M. R., Kabelitz, D., Meri, S., & Kalantar, K. The Effects of Type 2 Diabetes Mellitus on Organ Metabolism and the Immune System.

augment the sample size to enhance the robustness and generalizability of the findings. Addressing these limitations will contribute to a more comprehensive understanding of the complex interplay between therapeutic responses, clinical parameters, and endothelial changes in diabetic patients with macular edema.

5. CONCLUSION

In conclusion, this study provides clinical validation of prior research emphasizing the significance of investigating the corneal endothelium in cases of severe DR. Importantly, our findings demonstrate quantifiable alterations in the corneal endothelium even among patients with mild to moderate DR, despite possessing similar metabolic profiles and disease durations. These results underscore the imperative to explore corneal endothelial changes in diabetic patients, shedding light on potential dysfunctions in corneal cells that may impede various therapeutic and surgical interventions, including the use of contact lenses, refractive surgery, or cataract surgery. Such insights could inform more tailored and effective management strategies for individuals with diabetes mellitus.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was partially supported by the IDI&CA grant IPL/ 2021/DiffMeDiME_ESTeSL by the H&TRC- Health & Technology Research Centre, ESTeSL- Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa and the Instituto da Retina de Lisboa (IRL).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Conceptualisation, BS, JP, TB and PC; methodology, BS, JP, TB, RB, BP and PC; formal analysis, BS, JP, TB, RB, BP and PC; research, BS, JP, TB, BP and PC; writing - preparation of the original draft, BS, JP, TB and PC; supervision, RB, BP and PC; project coordination, PC. All the authors have read and agreed with the published version of the manuscript.

- Frontiers in Immunology, 11(July), 2020.
- Das, A. Diabetic Retinopathy: Battling the Global Epidemic. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(15): 6669, 2016.
- Durukan, I. Corneal endothelial changes in type 2 diabetes mellitus relative to diabetic retinopathy. *Clinical and Experimental Optometry*, 103(4): 474–478, 2020.
- El-Agamy, A., & Alsubaie, S. Corneal endothelium and central corneal thickness changes in type 2 diabetes mellitus. *Clinical Ophthalmology*, 11: 481–486, 2017.
- Gasecka, A., Siwik, D., Gajewska, M., Jaguszewski, M. J., Mazurek, T., Filipiak, K. J., et al. Early Biomarkers of Neurodegenerative and Neurovascular Disorders in Diabetes. *Journal of Clinical Medicine*, 9(9): 2807, 2020.
- Goldstein, A. S., Janson, B. J., Skeie, J. M., Ling, J. J., & Greiner, M. A. The effects of diabetes mellitus on the corneal endothelium: A review. *Survey of Ophthalmology*, 65(4): 438–450, 2020.
- Gonzalez, V. H., Campbell, J., Holekamp, N. M., Kiss, S., Loewenstein, A., Augustin, A. J., et al. Early and Long-Term Responses to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Diabetic Macular Edema: Analysis of Protocol I Data. *American Journal of Ophthalmology*, 172: 72–79, 2016.
- Gurung, R. L., FitzGerald, L. M., Liu, E., McComish, B. J., Kaidonis, G., Ridge, B., et al. Predictive factors for treatment outcomes with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections in diabetic macular edema in clinical practice. *International Journal of Retina and Vitreous*, 9(1): 1–10, 2023.
- International Diabetes Federation. Magliano DJ, Boyko EJ; IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee. IDF DIABETES ATLAS [Internet]. 10th edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581934/>.
- Jha, A., Verma, A., & Alagorie, A. R. Association of severity of diabetic retinopathy with corneal endothelial and thickness changes in patients with diabetes mellitus. *Eye (Basingstoke)*, 36(6): 1202–1208, 2022.
- Kaur, K., & Gurnani, B. Specular Microscopy. [Updated 2023 May 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585127/>.
- Lanza, M., Mozzillo, E., Boccia, R., Fedi, L., Di Candia, F., Tinto, N., et al. Analysis of Corneal Deformation in Paediatric Patients Affected by Maturity Onset Diabetes of the Young Type 2. *Diagnostics*, 13(8): 1–10, 2023.
- Marques, I. P., Madeira, M. H., Messias, A. L., Santos, T., Martinho, A. C.-V., Figueira, J., et al. Retinopathy Phenotypes in Type 2 Diabetes with Different Risks for Macular Edema and Proliferative Retinopathy. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5): 1433, 2020.
- Matsushita, Y., Takeda, N., Nakamura, Y., Yoshida-Hata, N., Yamamoto, S., Noda, M., et al. A comparison of the association of fasting plasma glucose and HbA1c levels with diabetic retinopathy in Japanese men. *Journal of Diabetes Research*, 2020.
- Mortazavi, S. A. A., Akhlaghi, M., Dehghani, A., Pourazizi, M., Malekhamadi, M., Fazel, M., et al. Diabetic retinopathy and corneal endothelial parameters: an analytical cross-sectional study. *BMC Ophthalmology*, 22(1): 1–7, 2022.
- Parravano, M., Costanzo, E., & Querques, G. Profile of non-responder and late responder patients treated for diabetic macular edema: systemic and ocular factors. *Acta Diabetologica*, (0123456789), 2020. doi:10.1007/s00592-020-01496-7.
- Pessoa, B., Malheiro, L., Carneiro, I., Monteiro, S., Coelho, J., Coelho, C., et al. Intravitreal ranibizumab or aflibercept after bevacizumab in diabetic macular edema: Exploratory retrospective analysis. *Clinical Ophthalmology*, 15: 253–260, 2021.
- Prager, S. G., Lammer, J., Mitsch, C., Hafner, J., Pemp, B., Scholda, C., et al. Analysis of retinal layer thickness in diabetic macular oedema treated with ranibizumab or triamcinolone. *Acta Ophthalmologica*, 96(2): e195–e200, 2018.
- Qi, Y. Y., Cui, L., Zhang, L., Jiang, Y., Ji, L. L., Qiu, Y. Y., et al. Effect of repeated intravitreal Ranibizumab and Aflibercept injections on the corneal nerves in patients with macular edema. *International Eye Science*, 23(5): 848–851, 2023.
- Shenoy, R., Khandekar, R., Bialasiewicz, A. A., & Al Muniri, A. Corneal endothelium in patients with diabetes mellitus: A historical cohort study. *European Journal of Ophthalmology*, 19(3): 369–375, 2009.
- Simó-Servat, O., Hernández, C., & Simó, R. Diabetic Retinopathy in the Context of Patients with Diabetes. *Ophthalmic Research*, 62(4): 211–217, 2019.
- Steinmetz, J. D., Bourne, R. R. A., Briant, P. S., Flaxman, S. R., Taylor, H. R. B., Jonas, J. B., et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*, 9(2): e144–e160, 2021.
- Taşlı, N. G., İcel, E., Karakurt, Y., Ucak, T., Ugurlu, A., Yilmaz, H., et al. The findings of corneal specular microscopy in patients with type-2 diabetes mellitus. *BMC Ophthalmology*, 20(1): 1–7, 2020.
- Teo, Z. L., Tham, Y. C., Yu, M., Chee, M. L., Rim, T. H., Cheung, N., et al. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*, 128(11): 1580–1591, 2021.
- Wong, T. Y., Cheung, C. M. G., Larsen, M., Sharma, S., & Simó, R. Diabetic retinopathy. *Nature Reviews Disease Primers*, 2: 17, 2016.
- Zheng, T., Le, Q., Hong, J., & Xu, J. Comparison of human corneal cell density by age and corneal location: An in vivo confocal microscopy study. *BMC Ophthalmology*, 16(1): 1–10, 2016.