

MESTRADO INTEGRADO

MEDICINA

Exames Oftalmológicos não Invasivos no Diagnóstico pré-clínico da Doença de Alzheimer

José Miguel Martins

M

2019



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Exames Oftalmológicos não Invasivos no Diagnóstico pré-clínico da Doença de Alzheimer

José Miguel Cardoso Martins

Endereço de correio eletrónico: dami-652@hotmail.com

Orientador

Doutor João Nuno de Melo Beirão

Assistente Hospitalar Graduado de Oftalmologia no Centro Hospitalar Universitário do Porto

Junho 2019

**Exames Oftalmológicos não Invasivos no Diagnóstico pré-clínico da
Doença de Alzheimer**

O Aluno:

A handwritten signature in cursive script that reads "Miguel Martins". The signature is written in a light grey or blue ink on a white background.

(José Miguel Cardoso Martins)

O Orientador:

A handwritten signature in cursive script that reads "Beirão". The signature is written in a light grey or blue ink on a white background.

(Dr. João Nuno de Melo Beirão)

Junho 2019

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Doutor João Nuno de Melo Beirão, por todo interesse prestado na redação desta revisão. A sua disponibilidade e prontidão nas respostas foram, sem dúvida alguma, o que permitiram a realização deste trabalho.

Resumo

Introdução: A doença de Alzheimer (AD) é o tipo de Demência mais comum, responsável por 60 a 70% dos casos, e está associada a degeneração do sistema nervoso central e perda progressiva de capacidades cognitivas culminando na morte do doente.

O diagnóstico definitivo de AD é realizado *postmortem*, por isso o diagnóstico é presumido através da associação de critérios clínicos, analíticos e de imagem. Os exames usados são subjetivos, dispendiosos ou invasivos e apenas detetam a doença numa fase avançada.

A AD não tem cura e o tratamento tem o intuito de impedir a progressão da doença, no entanto, uma vez que o diagnóstico só é feito com mais certeza numa fase mais avançada da doença, a sua eficácia é comprometida.

Com o objetivo de aproveitar a fase pré-clínica de AD para instituir a terapêutica e protelar o aparecimento dos sintomas, tem sido feita uma aposta na investigação e no desenvolvimento de testes de diagnóstico. Recentemente o globo ocular tem sido alvo dessa investigação pela sua proximidade com o SNC e possibilidade de detetar alterações de AD antes do aparecimento de sintomas de AD, através de exames não invasivos.

Objetivos: Fazer uma revisão da literatura acerca das alterações de AD documentadas até à data no globo ocular através de exames oftalmológicos não invasivos e distinguir as alterações detetadas que se manifestem em fases precoces da AD que possam ser usadas no rastreio e deteção precoce da doença melhorando o seu prognóstico.

Metodologia: Através de uma pesquisa eletrónica na Medline, JAMA, ARVO-IOVS usando combinações das palavras-chave *Alzheimer's Disease, ophthalmologic exams, eye exam, pre-clinical Alzheimer* foram obtidos artigos cujos *abstracts* foram analisados. Foram selecionados os artigos publicados a partir do ano de 2010 inclusivé, sendo excluídos posteriormente os artigos em que o *abstract* não fazia referência a alterações patológicas de AD no olho. Foram analisados também artigos da lista de referências de artigos quando necessário.

Desenvolvimento/Conclusões: Na retina são descritos como biomarcadores da AD a neurodegeneração, especialmente no quadrante superior nas camadas mais internas da retina, as alterações da vasculatura e a acumulação de A β . No cristalino é detetada a acumulação de A β com conseqüente opacificação na região supranuclear. O estudo do humor aquoso revelou a deteção de A β , no entanto este era recolhido por métodos invasivos, o que exclui a sua utilização como exame de rastreio. A córnea apresenta expressão de APP, no entanto não são relatados mais estudos até à data. A análise da lágrima parece um bom exame de rastreio pela sua acessibilidade e sua elevada sensibilidade. A resposta pupilar apresenta-se alterada em

resposta a anticolinérgicos, estímulos luminosos e durante a execução de atividades em doentes com AD, sendo que o último parece permitir diferenciar indivíduos em fase precoce da doença de indivíduos saudáveis.

A atribuição de especificidade às alterações no globo ocular de AD e distinção com outras patologias oculares ainda não é unânime, pelo que é necessária a realização de estudos com maior amostragem e metodologias comparáveis.

Palavras-chave: Alzheimer's disease, eye, biomarker, retina, anterior eye

Abstract

Introduction: Alzheimer's Disease (AD) is the most common type of Dementia, accounting for 60 to 70% of the cases, and it is associated with neurodegeneration and cognitive decline ending in the patient's death.

Definitive diagnosis of AD is made *postmortem*, so AD diagnosis is presumed through the association of clinical, analytical and imagiological criteria. However, these exams are subjective, expensive or invasive and are only able to detect the disease in an advanced stage.

AD does not have a cure and the treatment only delays the disease's progression. Since a more certain diagnosis can only be made in a more advanced stage, the efficiency of the treatment is compromised.

Investigation and exam development has been made to enable the treatment initiation in pre-clinical AD stage. Recently the eye has been involved in that investigation due to its origin in the central nervous system and the possibility of detecting features of AD before the onset of symptoms, through non-invasive exams.

Purpose: Review the literature about AD's features in the eye documented to date through non-invasive eye exams and to distinguish those which manifest themselves in earlier stages of AD making them usable as screening exams for the disease.

Methodology: An online research has been done in *Medline, JAMA, ARVO-IOVS* using combinations of the keywords *Alzheimer's Disease, ophthalmologic exams, eye exam, pre-clinical Alzheimer* gathering articles whose abstracts were then analysed. Articles from up to 2010 were included. After analysing the abstracts, those which did not refer to features of AD in the eye were excluded. Articles in the reference list of other articles were analysed when necessary.

Development/Conclusions: In the retina neural degeneration, specially in the upper quadrant and innermost layers, vascular abnormalities and A β deposits. A β is also detected in the lens leading to supranuclear opacification. Analysis of the aqueous humour revealed A β , but since it was obtained through invasive exams show little use in AD screening. Even though the cornea expressed APP, no further studying has been made. Tear analysis is presented as a new exam for earlier AD diagnosis due to its accessibility and high sensibility. Pupilar response is altered in response to anticholinergic agents, luminous stimuli and during task execution, being the latter able to distinguish earlier stages of AD from healthy individuals.

These features in the eye are not specific to AD and studies with bigger samples and comparable methodologies are needed to differentiate alterations in the eye due to AD or to other pathologies.

Keywords: Alzheimer's disease, eye, biomarker, retina, anterior eye

Lista de abreviaturas

AD – Doença de Alzheimer	MMSE – Mini-Mental State Examination
AFv – Assimetria do Fator vénula	NFT – Tranças neurofibrilares
AMD – Degeneração Macular Relacionada com a Idade	NGF – Fator de Crescimento Neuronal
APOE – Apolipoproteína E	NTG – Glaucoma de Tensão Normal
APP – Proteína Precursora de Amilóide	NIA-AA – National Institute on Aging-Alzheimer’s Association
ARVO-IOVS – Association for Research in Vision and Ophthalmology – Investigative Ophthalmology and Visual Science	NINCDS-ADRDA – National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association
A β - β -Amilóide	NMDA – N-Methyl-D-Aspartate
BFR – Fluxo Sanguíneo	OAG – Glaucoma de Ângulo Aberto
BFV – Velocidade do Fluxo Sanguíneo	OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
COMT – Centro Organizador de Microtúbulos	OCT – Optical Coherence Tomography
CT – Espessura da Coróide	OCTA – Optical Coherence Tomography Angiography
DARC – Detecção de Apoptose de Células da Retina	ONL – Camada Nuclear Externa
EZ – Zona Epsilóide	OPL – Camada Plexiforme Externa
FAZ – Zona Avascular da Fóvea	PERG – Padrões do Eletroretinograma
FDa – Dimensão Fractal arteriolar	PET – Positron Emission Tomography
FLIO – Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy	PEX – Síndrome Pseudoexfoliativo
GWv – Gradiente de Diâmetro das vénulas	POAG – Glaucoma de Ângulo Aberto Primário
GCL – Camada de Células Ganglionares	PS – Presenilina
HC+ - indivíduos assintomáticos com placas de amilóide	pTau – Forma hiperfosforilada da proteína Tau
HC- - indivíduos sem placas de amiloide detetadas	PVEP – Padrões dos Potencias Visuais Evocados
HSI – Hyperspectral Imaging Microscopy	RAI – Índice de Amilóide na Retina
INL – Camada Nuclear Interna	RGC – Células Ganglionares da Retina
IPL – Camada Plexiforme Interna	RNFL – Camada de Fibras Nervosas da Retina
JAMA – Journal of the American Medical Association	RPE – Epitélio Pigmentar da Retina
LC – <i>Locus Coeruleus</i>	RVP – Parâmetros Vasculares da Retina
LCR – Líquido Cefalorraquidiano	SD-OCT – Spectral Domain Optical Coherence Tomography
LDF – Função Linear Discriminante	SLO – Scanner Oftalmoscópico
LDRa – Ratio Comprimento/Diâmetro das arteríolas	SNC – Sistema Nervoso Central
MAP – Proteína Associada a Microtúbulos	VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial
MCI – Défice Cognitivo Ligeiro	

Índice

Introdução	1
Doença da Alzheimer	1
Globo ocular como alvo de rastreio ou diagnóstico precoce da Doença de Alzheimer	3
Objetivos	3
Metodologia	3
Desenvolvimento	4
Retina	4
Cristalino	13
Humor Aquoso	15
Córnea	16
Lágrima	16
Pupila	16
Conclusões	17
Perspetivas para o futuro	19

INTRODUÇÃO

Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (AD) é responsável por 60 a 70% dos casos de Demência ¹ e está associada a degeneração do sistema nervoso central (SNC) com perda progressiva de capacidades cognitivas, alterações de comportamento, no padrão do sono, dificuldades na marcha, na deglutição, culminando na morte do doente.

Em 2017, Portugal ocupava a 4ª posição no ranking de Demência da OCDE, com uma prevalência média estimada de 19,9 por cada 1000 habitantes, prevendo-se que em 2037 escale para cerca de 30 por cada 1000 habitantes ². Com o aumento da incidência de Demência, estima-se que em 2050 existam 150 milhões casos em todo o mundo. ³

Os achados histológicos característicos da AD são a acumulação de β -Amilóide ($A\beta$) extracelular e a presença de tranças neurofibrilares (NFT) intracelulares, contendo a forma hiperfosforilada da proteína Tau (pTau). ⁴

A $A\beta$ é produzida no cérebro quando a proteína precursora de amiloide (APP), uma proteína transmembranar presente na superfície celular dos neurónios, é metabolizada pela β -secretase e pela γ -secretase. ⁵

Em situações normais, a APP é metabolizada pela α -secretase, que ao clivar o domínio de $A\beta$, impede a formação da proteína amiloidogénica. ⁶ No entanto, nos doentes com AD, quando a APP é clivada pelas enzimas proteolíticas, inicialmente pela β -secretase, e depois pela γ -secretase origina a $A\beta$, sendo as variantes mais importantes $A\beta$ -42 e $A\beta$ -40. A $A\beta$ -42 é composta por mais dois resíduos hidrofóbicos quando comparada com a $A\beta$ -40, o que aumenta a sua insolubilidade e promove a sua agregação em fibrilas extracelulares de amiloide. ^{4,7}

Estas placas de amiloide para além de causarem sinaptotoxicidade e diminuição da atividade neuronal ⁸, reduzem também a plasticidade do sistema nervoso central provocando a AD. ⁹

Para além do tipo de AD esporádico, outros modelos permitem estudar os efeitos da acumulação de $A\beta$ como o Síndrome de Down, uma vez que o gene que codifica a proteína APP está presente cromossoma 21, mutações no APP ou nas presenilinas (PS-1 e PS-2), que são componentes da γ -secretase e podem provocar o aumento da produção de $A\beta$ ou da proporção $A\beta$ -42/ $A\beta$ -40, quer pelo aumento da produção de $A\beta$ -42 ou diminuição da produção de $A\beta$ -40. ^{4,10-12} A razão $A\beta$ -42/ $A\beta$ -40 é inversamente proporcional à idade de instalação de AD. ¹¹

A Tau é a principal proteína associada a microtúbulos (MAP) reguladora do transporte de componentes celulares dependente de cinesinas nos axónios e em grandes quantidades inibe o transporte centrífugo de componentes celulares como neurofilamentos, peroxissomas, mitocôndrias e vesículas para as neurites, o que impede o crescimento neuronal. A diminuição do

transporte de vesículas promove a agregação de material próximo do Centro Organizador de Microtúbulos (COMT), no corpo celular dos neurónios, formando as tranças neurofibrilares.¹³ Não está ainda bem esclarecido se a origem da pTau se deve à acumulação de A β que, por um mecanismo ainda desconhecido, causa a hiperfosforilação da proteína Tau com consequente formação das tranças neurofibrilares, ou se há um evento na AD que provoca simultaneamente a acumulação de A β e a formação de pTau.¹⁴

A apolipoproteína E (APOE) participa na *clearance* de A β e tem várias isoformas, sendo que a APOE4 está associada ao aumento da acumulação de A β e à formação das tranças neurofibrilares na AD, por interferir na fosforilação da Tau.^{4,7}

O diagnóstico definitivo de AD é histológico, através da identificação de depósitos extracelulares de A β e de tranças neurofibrilares intracelulares contendo pTau na biópsia cerebral. No entanto, como este só pode ser realizado *post-mortem*, o diagnóstico presuntivo de AD é realizado através da associação de critérios clínicos, analíticos e imagiológicos.¹⁵

Com o objetivo de antecipar o diagnóstico da AD, a *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) propõe uma série de critérios para detetar uma provável AD. Estes critérios apresentam uma sensibilidade e especificidade superiores a 80% na seleção de doentes com provável AD.⁴ Segundo estes critérios, um doente tem o diagnóstico provável de AD quando apresenta os critérios A (alteração precoce e progressiva na memória episódica) e pelo menos um dos critérios B (atrofia do lobo temporal medial), C (biomarcadores anormais no LCR como diminuição de A β , aumento de Tau ou pTau), D (padrão compatível na PET) ou E (AD familiar comprovada). Existem também critérios de exclusão que os doentes deverão cumprir, e que visam diferenciar a AD de outras causas médicas, neurológicas e psiquiátricas de alterações cognitivas súbitas ou reversíveis.¹⁵

Atualmente não existe cura para a AD, nem é possível a reversão sustentada da sintomatologia. Existem várias armas terapêuticas que são usadas com o intuito de impedir a progressão da doença como os inibidores da acetilcolinesterase (donepezilo, rivastigmina e galantamina) e, em casos mais severos, os antagonistas do recetor NMDA (memantina).⁴

A necessidade do cumprimento de vários critérios para o diagnóstico presuntivo de AD implica o adiamento do tratamento até que as alterações a nível neuronal evoluam para défices cognitivos mais severos, onde a terapêutica vai ser menos eficaz.¹⁶ Com o intuito de distinguir grupos no espectro da AD e maximizar os efeitos do tratamento, em 2011, a National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA) propôs a introdução da divisão dos doentes em 3 grupos: AD pré-clínica (em doentes assintomáticos)¹⁷; Défice Cognitivo Ligeiro/MCI (doentes sintomáticos, mas em fase pré-demência)¹⁸ e AD¹⁹.

Nesta fase pré-clínica da AD, conforme as alterações analíticas, imagiológicas e em exames cognitivos, os doentes podem ainda ser subdivididos em estágio 1 (amiloidose assintomática), 2 (amiloidose e neurodegeneração) e 3 (amiloidose, neurodegeneração e declínio cognitivo subtil), com a ressalva de que os estádios 1 e 2 poderão não progredir e, que o estágio 3 tem mais probabilidade de progredir para MCI.¹⁷

Em suma, o ideal seria aproveitar a fase pré-clínica de AD para instituir a terapêutica e protelar o aparecimento dos sintomas. Com esse intuito tem sido feita uma aposta na investigação e no desenvolvimento de testes capazes de detetar indivíduos na fase assintomática.¹⁶

Globo ocular como alvo de rastreio ou diagnóstico precoce da Doença de Alzheimer

A necessidade de procurar novos testes, que sejam acessíveis e menos dispendiosos, que possam efetivamente ser usados para antecipar o diagnóstico de AD é de extrema importância, e neste sentido, tem sido revelado um crescente interesse pelo globo ocular devido à sua continuidade com o SNC e à facilidade de aplicar testes não invasivos, graças à sua transparência.^{20,21}

A retina tem sido estudada como alvo de alterações de AD pela sua origem embriológica, na vesícula ótica do tubo neural,²² e vasculatura partilhadas com o SNC.²⁰

No entanto, o estudo de alterações específicas de AD na retina é dificultado pela própria idade de instalação da doença ser partilhada com outras doenças sistémicas e degenerativas da retina. A ocorrência de patologias em planos anteriores, como opacidades dos meios e formação de cataratas, limitam a visualização detalhada das alterações da retina. Por este motivo, os componentes anteriores do globo ocular começam também a ser estudados como possível alternativa ao estudo das alterações de AD no globo ocular.^{5,23}

OBJETIVOS

Esta revisão tem como objetivos compilar as alterações de AD documentadas até à data no globo ocular através de exames oftalmológicos não invasivos.

Também é objetivo desta revisão distinguir as alterações de AD no globo ocular que se manifestem em fases precoces da AD e que possam ser usadas como exame de rastreio e diagnóstico precoce.

METODOLOGIA

Através de uma pesquisa eletrónica na Medline, JAMA, ARVO-IOVS usando combinações das palavras-chave *Alzheimer's Disease*, *ophthalmologic exams*, *eye exam*, *pre-clinical Alzheimer* foram obtidos artigos cujos *abstracts* foram analisados. Foram selecionados os artigos publicados a partir

do ano de 2010 inclusivé, sendo excluídos posteriormente os artigos em que o *abstract* não fazia referência a alterações patológicas de AD no olho. Foram analisados também artigos da lista de referências de artigos quando considerado necessário.

DESENVOLVIMENTO

Retina

Estudos em modelos animais

Ning *et al.* e Perez *et al.* demonstraram que a acumulação de A β na retina é dependente da idade em ratos transgênicos com AD.^{24,25}

A acumulação de A β e de pTau em várias camadas da retina, no exame histológico, foi demonstrada por Shimazawa *et al.*²⁶, Liu *et al.*²⁷ e Park *et al.*²⁸. Dutescu *et al.* demonstraram a acumulação de A β não só na retina, mas também na córnea e no cristalino de ratos transgênicos com AD.²⁹

Para além da acumulação de A β na retina em ratos transgênicos com AD, Tsai *et al.* detetaram hipertrofia do epitélio pigmentar da retina (RPE) e diminuição da espessura da coróide (CT)³⁰ e Alexandrov *et al.* demonstraram a reação inflamatória ao longo do eixo antero-posterior da retina causada pela acumulação de A β em ratos transgênicos-AD.³¹ No entanto no estudo de Tsai *et al.* não foram observadas alterações na camada de células ganglionares da retina (RGC).³⁰

Mais recentemente, Chidlow *et al.* detetaram a expressão de APP na retina, no entanto não detetaram deposição de A β , nevrites distróficas, perda neuronal ou outra alteração indicativa de patologia na retina de ratos com AD.³²

Usando a Tomografia Ótica de Coerência (OCT), uma lente de contacto no olho dos ratos anestesiados e um fluorocromo, Schon *et al.* detetaram a presença de neurofibrilas com Tau *in vivo* na retina de ratos com mutação induzida da Tau, que posteriormente confirmaram com análise histológica.³³

Koronyo-Hamaoui *et al.* demonstram que usando microscopia ótica não invasiva em *ratos in vivo*, é possível a deteção de A β na retina com elevada resolução e especificidade, após a administração intravenosa do fluorocromo, curcumina, com alta afinidade para as placas de A β . As placas de amiloide detetadas apresentavam uma disposição perivascular e uma morfologia típica de estádios precoces de acumulação de A β : um núcleo denso de A β e sem as típicas fibrilhas radiais. Este foi o primeiro estudo a detetar A β na retina em estádios pré-clínicos de AD e demonstrou que esta acumulação na retina era proporcional à severidade clínica da AD.³⁴

Num estudo subsequente, monitorizaram a diminuição de A β na retina, usando a mesma técnica, após o tratamento com imunoterapia. Neste estudo reafirmaram que a acumulação de A β na retina precedia a acumulação no cérebro.³⁵

Posteriormente, Edwards *et al.* demonstram que a acumulação de A β na retina e consequente astrogliose, precedem as alterações no hipocampo e a fase clínica da AD. ³⁶

More e Vince usam hyperspectral imaging microscopy (HSI) em ratos *ex vivo*, sem adição de corantes e, através da dispersão da luz na retina, demonstram a acumulação de A β na retina em fases pré-clínicas de AD. ³⁷ Em 2016, mas *in vivo* utilizando o endoscópio em contacto com a superfície da córnea para obter imagens do fundo do olho dos ratos transgênicos com AD, More *et al.* replicam os resultados obtidos no estudo anterior e detetam um aumento da acumulação de A β na retina ao longo de 6 meses. ³⁸

Estudos em humanos

Neurodegeneração

Desde que em 1986, Hinton *et al.* detetaram neurodegeneração na histologia de retinas de doentes com AD, com perda axonal a nível do nervo ótico e diminuição da espessura da camada de fibras nervosas da retina (RNFL) com perda de RGC, têm sido feitos vários estudos que corroboram estes achados histológicos. ³⁹

Estas alterações detetadas *postmortem* têm sido observadas *in vivo* em doentes com AD, através de exames oftalmológicos não invasivos. Em termos de neurodegeneração, com a utilização da OCT foram descritas a diminuição da RNFL peripapilar e macular nos vários quadrantes da retina ⁴⁰⁻⁵¹, especialmente nos quadrantes superiores ^{42,46,47,50,52-54} e nasal ⁵⁵, associados a uma diminuição da espessura da GCL ^{56 42,43,57-59}, sendo que estas alterações também foram descritas em fases precoces de AD ^{42,46,49,60}.

Larrosa *et al.* detetaram diminuição da espessura da RNFL em todos os quadrantes da retina à exceção da fóvea e, utilizando os valores da espessura da RNFL obtidos pela OCT em todos os quadrantes da retina em doentes com AD, obtiveram uma função linear discriminante (LDF) que permitia distinguir entre doentes com AD e indivíduos saudáveis. Na segunda parte do estudo comprovaram os seus resultados, aplicando esta fórmula a um grupo de 50 indivíduos saudáveis e 50 doentes com AD obtendo uma área sob a curva de 0,965 para a Spectralis RNFL LDF. ⁴⁴

Bambo *et al.*, propõem a análise da cor do disco ótico como marcador da AD, uma vez que a sua palidez está associada à perda axonal. No seu estudo usaram SD-OCT e retinografias, com um *software* de análise colorimétrica à base de pigmentação dada pela hemoglobina, que revelou diminuição da espessura da RNFL e uma palidez do disco ótico nos doentes com AD. ⁶¹

Polo *et al.* detetaram diminuição da espessura da RNFL, especialmente no quadrante superior, e uma diminuição da espessura macular, em todos os setores à exceção da fóvea, que se correlacionava com a disfunção visual (acuidade visual, sensibilidade às cores e contraste). ⁶² Outros

estudos confirmaram a diminuição da espessura da RNFL e macular da retina nos doentes com AD, no entanto esta não se correlacionava com os resultados do MMSE. ^{40 63}

Em 2016, La Morgia *et al* elaboram um estudo com o objetivo de provar que a degeneração de RGC, especificamente das com melanopsina (mRGC), levavam à disfunção circadiana na AD. Durante o estudo examinaram as retinas através da OCT *in vivo*, e *postmortem* os tecidos na histologia. Os resultados deste estudo demonstraram uma diminuição da espessura da RNFL, especialmente no quadrante superior, visível na OCT, e histologicamente os doentes com AD apresentavam perda axonal no nervo ótico, perda de mRGC, com morfologia aberrante, associados a depósitos de A β . Os doentes apresentavam uma disfunção circadiana o que levou a que La Morgia *et al* concluíssem que a degeneração de mRGC desempenhava um papel fundamental nesta alteração do comportamento na AD. ⁶⁴

Lee *et al.* correlacionaram uma diminuição da espessura da lamina cribrosa (LCT) com o aumento dos valores de Tau no LCR, tanto em doentes saudáveis como em doentes com AD, sugerindo que a avaliação da LCT através da OCT pode ser usado como potencial biomarcador de AD. ⁶⁵

Ascaso *et al.* compararam a espessura da mácula e da RNFL em indivíduos saudáveis (HC), doentes com MCI e AD, usando OCT. A espessura da RNFL apresentava-se diminuída com a progressão da doença (HC > MCI > AD) e a espessura macular nos doentes com AD era menor que a espessura macular nos indivíduos saudáveis, no entanto, os doentes com MCI eram os que apresentavam maior espessura macular na OCT, tal foi explicado pela inflamação e gliose que ocorre em estádios precoces de AD. ⁶⁶ Gimenez-Castejon *et al.* detetaram esta diminuição progressiva da espessura macular e da RNFL nos indivíduos saudáveis, doentes com MCI e AD, sem observar o aumento da espessura macular nos doentes com MCI observadas no estudo de Ascaso *et al.* ^{66,67}

Num estudo prospetivo, Trebbastoni *et al* compararam a evolução da espessura peripapilar da RNFL de indivíduos saudáveis e de doentes com AD ao longo de 12 meses. No início do estudo, a espessura da peripapilar da RNFL nos doentes com AD apresentava-se diminuída, principalmente no quadrante superior e inferior, e ao longo de 12 meses houve uma diminuição mais acentuada no quadrante inferior que se correlacionava com o declínio cognitivo. ⁶⁸

Para além de detetarem diminuição da espessura da RNFL e das camadas GCL e (camada plexiforme interna) IPL na OCT de doentes com AD comparada com controlos, Ferrari *et al* correlacionaram a diminuição da GCL-IPL com a severidade clínica da AD. ⁶⁹

Gharbiya *et al.*, não encontraram no seu estudo diferenças significativas entre a espessura da RNFL, tal como nos estudos de Kurna *et al.* ⁷⁰ e Lad *et al.* ⁷¹, no entanto descreveram uma diminuição da CT. ⁷²

Uchida *et al* compararam as retinas de doentes com MCI, AD, demência não-AD e Parkinson e, tal como no estudo de Pillai *et al.* ⁷³, não detetaram diferenças na espessura da retina entre os grupos. Correlacionaram, no entanto, uma diminuição volume entre a zona epilóide (EZ) e a RPE, com uma menor performance cognitiva dos doentes. ⁷⁴

Das alterações neurodegenerativas referidas, parece que a degeneração de RGC no quadrante superior nas camadas mais internas da retina (RNFL e GCL, especialmente a GCL-IPL)^{57 42} estão mais associadas à AD do que a outras doenças degenerativas como o glaucoma ⁴³ e a degeneração macular associada à idade (AMD). ²³ Parece, no entanto, que os doentes com glaucoma, AMD e retinopatia diabética estão sujeitos a maior risco de desenvolver AD. ⁷⁵

Alterações na microvasculatura e na coróide

Berisha *et al* para além de detetarem alterações da espessura peripapilar da RNFL na OCT no quadrante superior em doentes com AD, foram os primeiros a descobrir alterações na vasculatura da retina associada à angiopatia amiloidótica da AD. Usando um laser Doppler, detetaram diminuição do diâmetro da coluna de sangue na veia da arcada temporal superior da retina, com diminuição do fluxo venoso na retina dos doentes com AD. ⁵⁰

Frost *et al* compararam os parâmetros vasculares da retina (RVP) obtidos por retinografias de indivíduos saudáveis e de doentes com AD com a extensão dos depósitos de A β corticais detetados pela PET. Nas retinografias de doentes com AD, observaram alterações nos RVP, nomeadamente atenuação vascular, alteração do diâmetro dos vasos, redução da complexidade da ramificação vascular e da tortuosidade das veias.

Um dos modelos logísticos propostos por Frost *et al*, baseado em 13 dos 19 parâmetros dos RVP que demonstravam diferenças significativas entre os indivíduos, identificou doentes com AD com uma sensibilidade de 81,2% e especificidade 75,7%, sugerindo a sua inclusão nos métodos de rastreio de AD. Um dos RVP, permite distinguir a AD das Demências Vasculares, uma vez que nestas o diâmetro das vénulas da retina está aumentado, e neste estudo, demonstraram, que por contrário, nos doentes com AD existe uma diminuição do diâmetro das vénulas. Na segunda parte do estudo, após os resultados da PET, dividiram o grupo de indivíduos saudáveis em indivíduos assintomáticos com placas de amiloide (HC+) e indivíduos sem placas de amiloide detetadas (HC-). Os HC+, representando a fase pré-clínica de AD, já apresentavam alterações de 2 dos 19 RVP: assimetria do fator vénula (AFv) e ratio comprimento/diâmetro das arteríolas (LDRa), demonstrando que as alterações na vasculatura da retina se iniciam na fase pré-clínica de AD, propondo o uso da retinografia no rastreio de AD. ⁷⁶

Cheung *et al.* concluem que na retina dos doentes com AD existem arteríolas e vénulas com menor diâmetro, mais tortuosas e com menor densidade vascular, tal como se sucede no cérebro dos

doentes com AD, pela redução da angiogénese devido à inativação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) quando se liga à A β nas placas de amilóide.⁷⁷

Williams *et al.* detetaram uma diminuição na dimensão fractal venular e uma diminuição na tortuosidade arteriolar na retina associada a doentes com AD, usando um *software* semiautomático para análise de imagens obtidas por retinografia⁷⁸.

Golzan *et al.* estabelecem uma relação entre alterações na vasculatura da retina e grau de deposição de A β neocortical, usando a OCT, um sistema de Dynamic Vessel Analysis e PET. Neste estudo, para além de detetaram a diminuição da espessura da RNFL, a deposição de A β no cérebro correlacionava-se negativamente com a amplitude da pulsatilidade venosa da retina e positivamente com a amplitude da pulsatilidade arterial da retina. Golzan *et al.* sugerem que o aumento da pulsatilidade arterial da retina se deve a uma distensão mecânica cíclica em resposta à sobrerregulação da expressão de APP e deposição de placas de amiloide que simula o efeito pulsátil mecânico na pressão arterial. No seu estudo, embora não tenham encontrado associação entre os diâmetros da vasculatura da retina e a grau de deposição de A β neocortical, sugerem que a avaliação dinâmica dos vasos da retina poderá ser mais útil no rastreio de AD.⁵⁶

Jiang *et al.* estabeleceram uma correlação entre a diminuição do fluxo sanguíneo (BFR) macular nas arteríolas e nas vénulas das retinas dos doentes e a severidade da doença, uma vez que estes parâmetros se apresentavam reduzidos nos doentes com MCI e ainda mais reduzidos nos doentes com AD, quando comparados com indivíduos saudáveis. Tanto a velocidade do fluxo sanguíneo (BFV) como a espessura da camada plexiforme interna (GCIPL) se apresentavam diminuídas nos doentes com AD.⁷⁹

Lee *et al.* estudaram a prevalência de alterações microvasculares da retina e a sua associação com demência. No seu estudo concluíram que indivíduos com hemorragias retinianas ou cruzamentos arteriovenosos tinham maior risco de desenvolver MCI e Demência vascular. No entanto não encontraram associação entre alterações da microvasculatura retiniana e o desenvolvimento de MCI ou Demência sem doença cerebrovascular, sugerindo que as alterações microvasculares da retina estão intimamente associadas com as cerebrais.⁸⁰

Gharbiya *et al.* comparam a espessura da RNFL e da CT entre indivíduos saudáveis e doentes com AD, usando a OCT e embora não encontrassem diferenças entre a espessura da RNFL nos dois grupos, detetaram uma diminuição da CT nos doentes com AD.⁷²

Bayhan *et al.* detetaram uma diminuição da CT em doentes com AD, no entanto esta não se correlacionava com os resultados do MMSE.⁵⁸

Trebbastoni *et al.* avaliam a CT, usando SD-OCT, em indivíduos saudáveis e doentes com AD no início do estudo e após 12 meses, revelando que para além da CT se apresentar diminuída no início do

estudo, a sua redução após 12 meses era mais pronunciada nos doentes com AD, no entanto esta não se correlacionava com os resultados no MMSE. O mesmo decorria na diminuição da acuidade visual nos doentes com AD. ⁸¹

Bulut *et al.*, que em 2016 já haviam correlacionado os resultados do MMSE e a CT em doentes com MCI e AD ⁸², compararam no estudo seguinte as alterações vasculares da retina observáveis na modalidade de angiografia da OCT (OCTA). Detetaram uma diminuição da densidade vascular na retina e da CT e um aumento da zona avascular da fóvea (FAZ) nos doentes com AD em relação aos indivíduos saudáveis. Embora não houvesse diferença estatisticamente significativa, identificaram uma diminuição no fluxo sanguíneo nas camadas externas da retina e na coróide. Concluem, propondo que a OCTA seja usada no rastreio de AD, uma vez que estabeleceram correlação entre os resultados no MMSE e os parâmetros de densidade vascular, CT e FAZ detetados na OCTA. ⁸³

Também utilizando a OCTA, O'Bryhim *et al.* detetaram um aumento da FAZ em indivíduos em fase pré-clínica da AD. ⁸⁴

Recentemente, Csincsik *et al.* realizaram um estudo utilizando uma variante do *scanner* oftalmoscópico (SLO), o UWF-SLO, que permite a análise da periferia da retina, para além das zonas B e C. Embora tenham detetado uma maior incidência de degenerescência macular associada à idade (AMD) nos doentes com AD, relataram que estes também apresentavam lesões AMD-like na periferia. Nos doentes com AD havia uma elevada acumulação de drusas na periferia, com predileção para o quadrante nasal superior. Após 2 anos de seguimento, detetaram um maior aumento das áreas de acumulação de drusas relativamente a indivíduos saudáveis. Neste estudo, analisaram também os RVP e apenas encontraram uma diminuição na dimensão fractal das arteríolas estatisticamente significativa nos doentes com AD. Csincsik *et al.* não detetaram um aumento da tortuosidade da vasculatura da retina como tinha sido descrito noutros estudos ^{77,78,85}, o que pode ser justificado por uma heterogeneidade nos modelos que calculam este parâmetro. Nos doentes com AD, descrevem um aumento no gradiente de diâmetro das vénulas (GWv), que se correlaciona a uma diminuição do fluxo sanguíneo. Csincsik *et al.* propõem que um aumento do GWv associado a uma menor dimensão fractal arteriolar (FDa), que se traduz numa rede capilar menos densa e menos complexa na periferia da retina, proporcione uma diminuição da oxigenação dos tecidos com degeneração e formação das drusas. ⁸⁶

Ukalovic *et al.*, analisando a retina de doentes com AD *postmortem*, confirmaram o aumento do número de drusas tanto maculares como periféricas e detetaram a presença de drusas temporais em indivíduos com MCI que se correlacionavam com a angiopatia amilodótica cerebral, indicando poder-se tratar de um biomarcador da AD. ⁸⁷

Acumulação de A β na retina

Koronyo-Hamaoui *et al.* marcaram as placas de A β usando o fluorocromo curcumina, o anticorpo anti-A β 40 ligado a outro fluorocromo (Cy5), ou ambos e analisaram os tecidos através de microscopia de fluorescência. Com este estudo foram os primeiros a detectar a presença de placas de amiloide na retina em doentes com clínica de AD e em estádios mais precoces, distinguindo-os de indivíduos não-AD pela ausência de A β na microscopia de fluorescência. ³⁴

No entanto, os estudos que se seguiram não foram todos unânimes na detecção de A β ou NFT com pTau. Na segunda parte do estudo já mencionado, Schon *et al* também detectaram a presença de pTau na retina de doentes com AD *postmortem*, no entanto não foram capazes de detectar placas de A β ou NFT.³³ No estudo alegam que o composto que usaram para a coloração dos tecidos (Tioflavina-S) apenas se liga às conformações fibrilares, o que pode explicar a incapacidade de detecção de placas amiloidóticas e de NFT, tal como aconteceu nos estudos de Hinton *et al* e de Blanks *et al.* ^{20,33}

Mais tarde, Ho *et al.* analisaram globos oculares de 11 doentes com AD e não detectaram a presença de A β ou de pTau na retina ou no cristalino, indiciando que a sua deposição no globo ocular ou as suas concentrações não são semelhantes na retina e no cérebro. Os próprios autores sugerem que a discrepância dos seus resultados pode dever-se a diferentes métodos de preparação, ensaios ou à refrigeração dos tecidos. ⁸⁸

Em 2014, Tsai *et al.* detectaram a presença de placas de amiloide na retina e uma diminuição da CT em doentes com AD quando comparados com indivíduos saudáveis. ³⁰

Num ensaio duplamente cego com 200 voluntários, Frost *et al.* aplicaram tecnologia ocular não invasiva para detectar A β na retina, após a administração intravenosa de curcumina, e obtiveram o índice de amiloide na retina (RAI). O RAI é calculado a partir do número, extensão e distribuição das placas de amiloide. Em resultados preliminares, este exame demonstrou ser capaz de distinguir os doentes com AD de indivíduos saudáveis, com uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 80,6%. Shaun Frost advoga a capacidade de este exame detectar a AD 15 a 20 anos antes da sua fase clínica. Neste estudo propõem que este exame seja usado como complemento aos exames de rastreio utilizados. ⁸⁹

Kayabasi *et al* usando OCT e autofluorescência analisaram retinas de doentes com AD e detectaram depósitos de amiloide na retina, principalmente perimaculares e perivasculares na camada plexiforme externa (OPL), na GCL e na RNFL. ²³

No estudo de La Morgia *et al.*, também foram detectadas placas de amiloide no quadrante temporal superior da retina, nomeadamente A β nas mRGC e suas neurites, em tecidos oculares de doentes com AD, associados a neurodegeneração. As placas de amiloide apresentam-se tipicamente na forma de aglomerados, mas neste estudo detectaram diferentes tipos de deposição extracelular de

A β como placas imaturas, placas de amiloide densas com fibrilhas radiais ou até placas compactas com vários núcleos densos. A presença de A β intracelular e perivascular também foi relatada.⁶⁴ Embora até 2016, vários estudos tenham revelado resultados promissores, segundo a metanálise de Jiang *et al.*, a inconsistência entre estudos e a sua heterogeneidade de significância estatística não permitem a determinação de conclusões acerca do uso da detecção de A β na retina como diagnóstico de AD.⁹⁰

Em 2017, Koronyo *et al.* elaboram um estudo para confirmar a semelhança entre os depósitos de A β na retina e no cérebro e posteriormente fizeram um estudo para averiguar a exequibilidade da transposição do seu estudo em ratos *in vivo*³⁴ para humanos com AD *in vivo*. De início, usando vários anticorpos anti-A β e outros corantes distinguiram indivíduos sem AD de doentes com AD conforme a presença de pobres e difusos depósitos de A β ou existência de placas densas de A β , respetivamente. De seguida, analisando os tecidos de retina e cérebro confirmou-se a existência de correlação entre os depósitos de A β nos tecidos, embora os aglomerados de A β na retina fossem menores em tamanho, assemelhavam-se à morfologia das placas de A β e à vasculatura observada no cérebro.⁹¹ Usando microscopia eletrónica foram também detetados outros tipos de depósitos de beta-amiloide, tal como descritos em estudos anteriores⁶⁴ e concluíram que a eficácia do fluorocromo curcumina era sobreponível à dos outros corantes utilizados.⁹¹

Nos doentes com AD, a A β foi detetada mais frequentemente na periferia do quadrante superior e menos frequentemente no pólo posterior da retina. A deposição de A β também se apresentava em regiões perivascularares, ao longo da vasculatura na GCL, na RGC e em camadas mais internas da retina, onde também são observadas estruturas *NFT-like*. A acumulação de A β era acompanhada por neurodegeneração com perda celular na GCL, camada nuclear interna (INL) e camada nuclear externa (ONL) da retina.

A segunda parte do estudo implicava a administração oral de curcumina nos doentes com AD, doentes com demência não-AD e a indivíduos saudáveis, com posterior análise da fluorescência no fundo de olho através do SLO. Nos doentes com AD, o RAI era significativamente mais elevado que o dos indivíduos não-AD (55,7 > 11,2), a localização dos depósitos de amiloide era concordante com os achados histológicos prévios, com uma RPE e membrana de Bruch íntegras e sem degenerescência macular na OCT. Por oposição aos 2 doentes com AMD no estudo, que apresentavam fluorescência difusa no pólo posterior da retina e drusas sub-RPE. O RAI não se correlacionava com a idade, nem com o resultado do MMSE dos doentes com AD.⁹¹

Exames

A OCT tem sido usada para o estudo de alterações neurodegenerativas da AD na retina e, segundo meta-análises recentes^{92,93 94}, concluiu-se que existe uma diminuição da espessura da RNFL nos

doentes com AD e que, nos doentes com MCI, as alterações da RNFL comparativamente aos indivíduos saudáveis, se manifesta especialmente nos quadrantes inferiores e nasais, excluindo o quadrante superior. No final sugerem que esta tecnologia, nomeadamente a versão Spectral Domain (SD-OCT), pode ser usada para detetar alterações precoces na RNFL de doentes com AD, embora sejam necessários mais estudos para desenvolver um *cut-off* de espessura da RNFL.⁹² São apresentadas como limitações dos estudos avaliados o facto de serem transversais e não poderem ser tiradas conclusões sobre o *timing* da diminuição da espessura da RNFL, a falta de confirmação histológica do diagnóstico de AD e o número limitado de doentes estudados.^{92,93} Para detetar alterações da vasculatura da retina têm sido utilizadas extensões funcionais da OCT, como a angiografia^{82,83} e o Doppler⁵⁰.

O SLO, usando tecnologia de reconstrução tridimensional, permite detetar alterações na vasculatura da retina, acumulação de drusas na periferia, preferencialmente no quadrante nasal superior⁸⁶ e distinguir doentes com AD de doentes com glaucoma⁷⁰. Quando associada a corantes como a curcumina deteta a deposição de A β ⁹¹ e a anexina 5 permite detetar a apoptose de células da retina (DARC).^{95,96} Esta técnica foi desenvolvida no âmbito do estudo do glaucoma e encontra-se em fase II de estudos clínicos.⁹⁷⁻⁹⁹

Utilizando a oximetria da retina, Einarsdottir *et al.* e Stefansson *et al.* detetaram um aumento na saturação de oxigénio nos vasos da retina de doentes com AD em comparação com indivíduos saudáveis.^{100,101} Depois comprovaram estas alterações em estádios mais precoces de AD, como os indivíduos com MCI, sendo que nestes, a diferença de saturação de oxigénio arteriovenosa estava diminuída em virtude de menor atividade metabólica na retina, o que pode estar relacionada com a diminuição da espessura da RNFL.¹⁰²

A técnica *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy* (FLIO) permite detetar a autofluorescência da retina ao longo de 10 minutos após a sua excitação por um laser. Jentsch *et al.* realizaram um estudo em que comparavam FLIO à OCT na capacidade de detetar alterações na retina de 16 doentes com AD. A autofluorescência da retina, medida pelos parâmetros do scanner FLIO correlacionava-se com os resultados de MMSE e com os valores de Tau e pTau-181 no LCR e, uma vez que a espessura da RNFL, escavação do disco ótico ou espessura macular detetadas pela OCT não se correlacionavam com os valores no LCR ou no MMSE, concluíram que esta nova técnica era superior à OCT na deteção da AD.¹⁰³

A tecnologia HSI, baseada na captação de radiação infravermelha por um endoscópio tópico modificado, utilizada por More *et al.* permite a deteção de A β na retina em estádios pré-clínicos de AD, sem recorrer ao uso de corantes, no entanto ainda não existem estudos em humanos.^{37,38}

Krasodomska *et al.* detetaram alterações nos padrões do eletroretinograma (PERG) e nos padrões dos potenciais visuais evocados (PVEP) em fases precoces da AD, associados a degeneração das RGC.¹⁰⁴ No entanto pela necessidade de cooperação no exame, em doentes que podem já ter alterações comportamentais, Liao *et al.* sugerem que poderá não ser um bom método de rastreio.⁹⁷

Cristalino

Estudos em modelos animais

Vários estudos detetaram a expressão de presenilina^{105,106}, ou de seus componentes¹⁰⁷ no cristalino que, em situações de stress oxidativo tal como as que sucedem no cérebro de doentes com AD, resultava em acumulação de A β .^{106,108}

A expressão de A β , APP e presenilina no cristalino foi confirmada em estudos subseqüentes em mamíferos^{29,109}, sendo que Frederikse *et al.* detetou uma degenerescência da região posterior sob a cápsula intacta, associada à sua expressão.¹⁰⁵

Estudos em humanos

Frederikse *et al.* comprovou a semelhança entre as placas de amiloide detetadas no cristalino com as observadas no cérebro, usando os corantes vermelho do Congo e Tioflavina em amostras *postmortem* de doentes com AD.¹⁰⁹ Em 2002, Frederikse *et al.* detetou sobreexpressão de APP no cristalino com maior sensibilidade do que na córnea ou mesmo na retina de animais transgênicos com AD. Neste estudo, afirma também que a APP presente no cristalino é mais longa e poderá ter maior potencial deletério, levando a uma mais rápida degeneração do cristalino.¹¹⁰

Goldstein *et al.* detetaram a correlação entre os valores de A β -40 e A β -42 e a sua concentração no cérebro. A acumulação de A β no cristalino de doentes com AD estava restringida ao citoplasma das células fibrosas supranucleares ou corticais profundas. Os 9 doentes com AD apresentavam-se com cataratas equatoriais supranucleares, enquanto que os controlos não apresentavam cataratas.¹¹¹ Esta localização distingue-se das cataratas associadas à idade que se dispõem numa região mais central e cortical.¹¹²

Moncaster *et al.*, estudaram doentes com Síndrome de Down, uma vez que a trissomia 21 implica maior produção de APP, e comprovaram uma maior acumulação de A β no cristalino, tal como acontece no cérebro, sendo que esta se correlacionava com a opacificação supranuclear.¹¹³

Bei *et al.* detetaram a presença de cataratas *postmortem* no grupo com AD em comparação com indivíduos normais, no entanto após a correção para a idade não havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos, concluindo que é improvável que a opacidade do cristalino se torne uma medição não invasiva do risco de desenvolver AD.¹¹⁴

Kerbage *et al.* efetuaram um estudo *in vivo*, usando o sistema SAPPHIRE que combina a técnica FLIO, do estudo de Jentsch *et al.* ¹⁰³, com um ligando fluorescente com afinidade para A β , que complementou os achados de Goldstein *et al.* ¹¹¹, ao detetar fluorescência no cristalino pela acumulação de A β , preferencialmente na região supranuclear profunda sob a cápsula nos doentes com AD. Quando comparados com indivíduos saudáveis, a fluorescência emitida pelo cristalino é maior nos doentes com AD, mesmo nas regiões do córtex cristalino. Os doentes com AD apresentavam o dobro das concentrações de A β no cristalino quando comparados a indivíduos saudáveis. ¹¹⁵

No estudo seguinte, revalidaram as suas conclusões correlacionando os valores de fluorescência detetados no cristalino com a acumulação de A β cortical detetada pela PET e propuseram um *cut-off* de captação de fluorescência de 0,367 que detetava, com 85% de Sensibilidade e 95% de Especificidade, os doentes com clínica de AD. ¹¹⁶ No entanto, neste estudo foram excluídos os casos em que a PET ou o sistema SAPPHIRE fizeram previsões incorretas, o que prejudica a veracidade do estudo. ⁵

Por outro lado, os estudos não são unânimes, uma vez que Michael *et al.* não detetarem acumulação de A β no cristalino, usando vermelho do congo, tioflavina e anticorpos anti-A β em nenhum dos doentes com AD. Concluíram também que a opacificação da região cortical não era uma característica específica dos doentes com AD. ^{117,118} Resultados semelhantes foram apresentados por Ho *et al.* ⁸⁸ e por Williams *et al.* ¹¹⁹.

Tian *et al.* concluem que o cristalino poderá ser um biomarcador de AD, no entanto são necessários mais estudos prospetivos, nomeadamente para avaliar a capacidade do sistema SAPPHIRE ¹¹².

Humor Aquoso

Detecção de A β

Goldstein *et al.* usando análise de espectrometria de massa anti-A β , detetaram presença de A β -40 no humor aquoso em concentrações comparáveis com as detetadas no LCR em indivíduos sem AD sujeitos a exérese de cataratas. ¹¹¹

Prakasam *et al.* sugerem que a A β , produzida no RPE, é difundida pelo humor vítreo e humor aquoso. Analisando globos oculares de bovinos e ratos transgênicos, detetaram valores elevados de APP no humor vítreo, enquanto que no humor aquoso estes se apresentavam diminuídos, sugerindo a existência de uma barreira molecular para esta proteína. No entanto, as concentrações de A β -42 e A β -40 no humor aquoso eram metade das concentrações detetadas no humor vítreo, concluindo que haveria uma passagem mais livre dos metabolitos de APP, podendo estas ser marcadores da AD. ¹²⁰

Associação com Glaucoma ou Síndrome Pseudoesfoliatiivo

Bayer *et al.* num estudo retrospectivo detetaram um aumento da prevalência de glaucoma em doentes com AD ou Parkinson. ¹²¹

Janciauskiene *et al.* analisaram o humor aquoso de doentes com glaucoma ou Síndrome Pseudoesfoliatiivo (PEX), recolhido durante cirurgia de exérese de catarata. Detetaram a presença de A β e proteínas inflamatórias no humor aquoso de doentes com PEX e glaucoma, sugerindo uma relação entre estas patologias e a AD. ¹²² Mais tarde, confirmaram de novo a presença de A β no humor aquoso de doentes sujeitos a exérese de catarata com outras patologias oculares, no entanto a concentração de A β no humor aquoso não era específica de nenhuma destas patologias. ¹²³

Mais tarde, Lesiewska *et al.* avaliaram a concentração de A β no plasma e humor aquoso e a função cognitiva em doentes com PEX e, quando as compararam com doentes saudáveis, não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quer nas concentrações de A β , quer na função cognitiva. Neste estudo relatam ausência de relação entre PEX e AD ou função cognitiva em pacientes com cataratas. ¹²⁴

Para avaliar se o diagnóstico de Glaucoma de Tensão Normal (NTG) aumentava o risco de desenvolver AD, Bach-Holm *et al.* seguiram doentes com NTG por uma média de follow-up de 12,7 anos. Nenhum dos pacientes com NTG desenvolveu AD, pelo que concluíram que o diagnóstico de NTG não é um preditor do desenvolvimento de AD. ¹²⁵

Ou *et al.* avaliaram retrospectivamente doentes com Glaucoma de Ângulo Aberto (OAG) e observaram que doentes com idade superior a 68 anos diagnosticados com OAG apresentavam

risco diminuído de desenvolver AD e concluem que, embora sejam ambas doenças degenerativas relacionadas com a idade, não foi detetada associação positiva entre as duas. ¹²⁶

Keenan *et al.*, num estudo de maior escala, comprovaram que o diagnóstico de Glaucoma de Ângulo Aberto Primário (POAG) não aumenta o risco de AD, no entanto está levemente associado ao aparecimento de demência vascular. ¹²⁷

Wostyn *et al.* sugerem que a acumulação de A β no humor aquoso e lesão da RGC no POAG se devam ao aumento da pressão intraocular. O aumento da pressão intraocular é consequência da diminuição do transporte paravascular no globo ocular, que à semelhança do sistema glinfático no cérebro, é responsável pela *clearance* de solutos intersticiais da retina. ¹²⁸

Córnea

Frederikse *et al.* detetaram a expressão de presenilinas no epitélio corneano de mamíferos ¹⁰⁶ e, mais tarde de APP ¹¹⁰, como outros estudos comprovaram. ^{29,120} Este APP presente na córnea e no cristalino tem maior potencial deletério do que o expresso na retina ou no cérebro, pela sua maior sequência de aminoácidos ¹¹⁰.

Lágrima

Analisando a lágrima de doentes com AD e de indivíduos saudáveis, Kallo *et al.* observaram um aumento na produção de lágrima e na concentração das proteínas. Através de análise proteómica, detetaram um aumento da dermcidina, proteína com atividade antimicrobiana, e uma diminuição de proteínas produzidas pela glândula lacrimal, responsáveis pela primeira linha de defesa do olho. Os autores propuseram o uso da combinação destas proteínas (lipocalina-1, dermcidina, lisozima-C e a glicoproteína extracelular lacritina) como biomarcador da AD que, no seu estudo, apresentava uma Sensibilidade de 80% e uma Especificidade de 77%, no entanto recomendam a validação da representatividade deste estudo em estudos de maior escala. ¹²⁹

Pupila

Vários estudos estudaram a dilatação pupilar em resposta a tropicamida e pilocarpina em doentes com AD. Embora houvesse tendência para um maior aumento da dilatação pupilar nestes doentes, esta alteração não apresentava especificidade suficiente para ser usada como biomarcador de AD.

Mais tarde foi estudada a resposta pupilar a um estímulo luminoso em doentes com AD. Detetaram diminuição da constrição pupilar máxima em doentes com AD ^{130,139,140}, que se associava à acumulação de Aβ no córtex, inclusivé em doentes em fases pré-clínicas de AD. ⁷⁶

A estimulação luminosa repetitiva exacerbava a diminuição da resposta pupilar em doentes com MCI e AD, sendo que a resposta pupilar se associava aos marcadores de AD no LCR. ¹⁴¹

Recentemente novos estudos começaram a analisar a resposta pupilar durante a execução de atividades, como a abdução dos dedos, em doentes em fases precoces de AD. ^{142,143} Esta abordagem tem como base a dilatação pupilar durante a execução de atividades como um esforço compensatório dos sistemas neurais, modulada pelo *locus coeruleus* (LC). Tal como esperado, detetaram um aumento da dilatação pupilar durante a execução de atividades em doentes com MCI, sendo capazes de distinguir indivíduos com MCI de indivíduos saudáveis por um aumento da dilatação pupilar e, mesmo dentro deste grupo, a dilatação pupilar era superior nos que apresentavam alterações da memória em relação aos que não tinham défices de memória. ¹⁴² No entanto, em fases mais avançadas da doença, como MCI com vários componentes cognitivos afetados e doentes com AD, depararam-se com uma diminuição da dilatação pupilar durante a execução de atividades. ¹⁴³ Os autores concluem que embora em fases precoces da AD já exista disfunção do LC, durante a execução de atividades, se observa um aumento paradoxal resposta do LC que se traduz numa dilatação pupilar aumentada comparativamente a indivíduos saudáveis. No entanto, à medida que há acumulação de défices cognitivos, o LC não é mais capaz de modular a dilatação pupilar, culminando assim em respostas pupilares inferiores à de indivíduos saudáveis.

^{142,143}

Propõem que este teste seja utilizado no rastreio da AD e sugerem que o número ideal de repetição da abdução dos dedos seja entre 3 e 6 para testar a resposta pupilar, no entanto afirmam que são necessários mais estudos para confirmar a exequibilidade do teste. ¹⁴²

Conclusões

É atualmente aceite que, para além de causar a degeneração do SNC, a AD também causa alterações no globo ocular. Como estas parecem preceder a fase sintomática da doença, o seu estudo poderá permitir antecipar o diagnóstico de AD e o início do tratamento da sintomatologia com maior eficácia.

Dentro dos componentes do globo ocular, a retina é o mais amplamente estudado, pelas suas alterações a nível de neurodegeneração, vasculatura e acumulação de Aβ. Embora a neurodegeneração não seja uma alteração específica da doença, sugere-se que a sua deteção pela OCT no quadrante superior nas camadas mais internas da retina (RNFL e GCL, especialmente a GCL-

IPL)⁵⁷ ⁴² são mais específicas da AD e podem ser úteis para a distinguir de outras doenças degenerativas como o glaucoma ⁴³ e a AMD. ²³ As alterações da vasculatura da retina estão também a ser alvo de estudo e através do uso de OCTA, Doppler e inteligência artificial na análise dos RVP permitiram distinguir a AD de Demências Vasculares e detetar alterações em fases precoces da AD. ^{56,83-85} Também foram detetadas alterações da cor do disco ótico nos doentes com AD e acumulação de drusas periféricas ⁶¹, sendo que os indivíduos em fases precoces da doença já apresentavam drusas na região temporal. ⁸⁷ A acumulação de A β na retina é o marcador mais específico da doença e estão a ser desenvolvidas várias técnicas que permitem a sua deteção *in vivo* pela marcação com fluorocromos ⁹¹ e até a sua deteção sem a administração de corantes, através de HSI, no entanto esta tecnologia ainda não foi aplicada em humanos.

No cristalino, os estudos não são unânimes, mas parecem sugerir a deteção de opacificação supranuclear como um marcador de AD, tal como foi descrito por Kerbage *et al.* ao detetar a acumulação de A β *in vivo*, especialmente nesta região. Neste estudo propuseram um *cut-off* de captação de fluorescência de 0,367 que detetou, com 85% de Sensibilidade e 95% de Especificidade os doentes com AD. A acumulação de A β no cristalino era proporcional à acumulação no cérebro, no entanto são necessários estudos em maior escala para comprovar a validade do sistema SAPPHERE. ¹¹⁶

A análise do humor aquoso permitiu compreender que as alterações da AD também são visíveis neste componente, no entanto para além da presença de A β no humor aquoso não parecer ser específica da doença, a obtenção de amostras é realizada através de uma medida invasiva, pelo que não será o exame de rastreio ideal para a AD, a não ser que os dados retirados desta manobra invasiva permitissem um diagnóstico claro da doença.

Os estudos não são unânimes a afirmar que doentes com glaucoma, AMD ou retinopatia diabética sejam propensos a desenvolver AD, mas estudos recentes negam a associação entre AD e PEX ou glaucoma.

A córnea é um componente pouco estudado, no entanto apresenta-se como um tecido de fácil acessibilidade e, dada a própria fisiopatologia da AD levar a uma atrofia basal e de neurónios colinérgicos com diminuição de fator de crescimento neuronal (NGF), permite inferir que a regeneração corneana, dependente de NGF, estaria também afetada e que a degeneração corneana poderia ser usada no rastreio e diagnóstico precoce de AD.

A análise das alterações dos componentes da lágrima poderá tornar-se um bom marcador da doença, no entanto será necessário aguardar por resultados de estudos com maior amostragem.

Inicialmente a resposta pupilar a anticolinérgicos em doentes com AD não revelou resultados congruentes, no entanto, mais tarde, o estudo da reatividade a estímulos luminosos e, principalmente, da dilatação pupilar durante a execução de atividades apresenta resultados promissores que permitem distinguir doentes saudáveis de doentes com MCI ou AD. ^{142,143}

Perspectivas para o futuro

A realização de ensaios clínicos com maior amostragem é necessária para validar a aplicabilidade destes exames não invasivos e comprovar a sua utilidade no diagnóstico precoce de AD. Nestes estudos deverão ser incluídos pacientes com outras demências e patologias oculares para que possam ser estudadas as alterações que as diferenciam.

A combinação dos exames oftalmológicos não invasivos é essencial para aumentar a sensibilidade do rastreio e permitir a estratificação de doentes em risco de desenvolver AD. Prevê-se que, no futuro, o diagnóstico precoce de AD seja ditado pela combinação de vários exames oftalmológicos e não através de um exame único.

O estudo de novos exames para diagnóstico precoce de AD continua em desenvolvimento, prevendo-se a observação *in vivo* da córnea, através de microscopia confocal, o uso de microperimetria que está a ser estudada no âmbito do glaucoma, a transposição da HSI para humanos, detetando A β sem uso de corantes e o desenvolvimento de novos exames como um feixe de luz polarizada que permita a deteção de A β na retina. ¹⁴⁴ Atualmente está a decorrer o ensaio clínico europeu ADDIA, em que são analisados fluidos periféricos de doentes com AD, incluindo sangue e lágrimas, para testar a sua utilização no rastreio da doença. ¹⁴⁵

A inteligência artificial está a ganhar terreno no campo da oftalmologia ¹⁴⁶ e tem-se revelado uma vantagem na análise de informação recolhida por exames oftalmológicos não invasivos, quer sejam imagens ou autofluorescência emitida pelos componentes, e sua comparação com bases de dados de indivíduos saudáveis. Através do desenvolvimento de *softwares* têm sido criados *cut-offs* que permitem diferenciar doentes em fases precoces de AD de indivíduos saudáveis com elevada sensibilidade e especificidade. ¹¹⁶

Com os avanços da tecnologia e da inteligência artificial prevê-se uma antecipação do diagnóstico de AD com melhoria do prognóstico dos doentes, após o início do tratamento.

Bibliografia

1. Duthey B. Background paper 6.11: Alzheimer disease and other dementias. *A Public Health Approach to Innovation* 2013;1-74.
2. OECD. *Health at a Glance 2017* 2017.
3. Patterson C. *World Alzheimer Report 2018: The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers*. Alzheimer's Disease International (ADI): London, UK 2018.
4. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *The Lancet* 2011;377:1019-31.
5. Dehghani C, Frost S, Jayasena R, Masters CL, Kanagasigam Y. Ocular Biomarkers of Alzheimer's Disease: The Role of Anterior Eye and Potential Future Directions. *Anterior Eye and Markers of Alzheimer's Disease. Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2018;59:3554-63.
6. Goedert M, Spillantini MG. A Century of Alzheimer's Disease. *Science* 2006;314:777-81.
7. Marr RA, Hafez DM. Amyloid-beta and Alzheimer's disease: the role of neprilysin-2 in amyloid-beta clearance. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2014;6.
8. Meyer-Luehmann M, Mielke M, Spiess-Jones TL, et al. A Reporter of Local Dendritic Translocation Shows Plaque-Related Loss of Neural System Function in APP-Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience* 2009;29:12636-40.
9. Williams CM, Andermann ML, Goldey GJ, et al. Synaptic plasticity defect following visual deprivation in Alzheimer's disease model transgenic mice. *J Neurosci* 2012;32:8004-11.
10. Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2009;41:1261-8.
11. Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, et al. Presenilin clinical mutations can affect γ -secretase activity by different mechanisms. *Journal of neurochemistry* 2006;96:732-42.
12. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature medicine* 1996;2:864.
13. Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow E-M. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *The Journal of cell biology* 2002;156:1051-63.
14. Small SA, Duff K. Linking A β and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 2008;60:534-42.
15. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *The Lancet Neurology* 2007;6:734-46.
16. Asih PR, Chatterjee P, Verdile G, Gupta VB, Trengove RD, Martins RN. Clearing the amyloid in Alzheimer's: progress towards earlier diagnosis and effective treatments - an update for clinicians. *Neurodegener Dis Manag* 2014;4:363-78.
17. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia* 2011;7:280-92.
18. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia* 2011;7:270-9.
19. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia* 2011;7:263-9.

20. Shah TM, Gupta SM, Chatterjee P, Campbell M, Martins RN. Beta-amyloid sequelae in the eye: a critical review on its diagnostic significance and clinical relevance in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2017;22:353-63.
21. Frost S, Martins RN, Kanagasingam Y. Ocular biomarkers for early detection of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010;22:1-16.
22. Venters SJ, Mikawa T, Hyer J. Central and peripheral retina arise through distinct developmental paths. *PLoS one* 2013;8:e61422.
23. Hart NJ, Koronyo Y, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. Ocular indicators of Alzheimer's: exploring disease in the retina. *Acta Neuropathol* 2016;132:767-87.
24. Perez SE, Lumayag S, Kovacs B, Mufson EJ, Xu S. Beta-amyloid deposition and functional impairment in the retina of the APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:793-800.
25. Ning A, Cui J, To E, Ashe KH, Matsubara J. Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:5136-43.
26. Shimazawa M, Inokuchi Y, Okuno T, et al. Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *Journal of neurochemistry* 2008;107:279-90.
27. Liu B, Rasool S, Yang Z, et al. Amyloid-peptide vaccinations reduce β -amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. *The American journal of pathology* 2009;175:2099-110.
28. Park SW, Kim JH, Mook-Jung I, et al. Intracellular amyloid beta alters the tight junction of retinal pigment epithelium in 5XFAD mice. *Neurobiology of aging* 2014;35:2013-20.
29. Dutescu RM, Li Q-X, Crowston J, Masters CL, Baird PN, Culvenor JG. Amyloid precursor protein processing and retinal pathology in mouse models of Alzheimer's disease. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2009;47:1213-21.
30. Tsai Y, Lu B, Ljubimov AV, et al. Ocular changes in TgF344-AD rat model of Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:523-34.
31. Alexandrov PN, Pogue A, Bhattacharjee S, Lukiw WJ. Retinal amyloid peptides and complement factor H in transgenic models of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2011;22:623.
32. Chidlow G, Wood JP, Manavis J, Finnie J, Casson RJ. Investigations into Retinal Pathology in the Early Stages of a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2017;56:655-75.
33. Schon C, Hoffmann NA, Ochs SM, et al. Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLoS One* 2012;7:e53547.
34. Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov AV, et al. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *Neuroimage* 2011;54 Suppl 1:S204-17.
35. Koronyo Y, Salumbides BC, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. Alzheimer's disease in the retina: imaging retinal A β plaques for early diagnosis and therapy assessment. *Neurodegener Dis* 2012;10:285-93.
36. Edwards MM, Rodriguez JJ, Gutierrez-Lanza R, Yates J, Verkhratsky A, Luttjy GA. Retinal macroglia changes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Eye Res* 2014;127:252-60.
37. More SS, Vince R. Hyperspectral imaging signatures detect amyloidopathy in Alzheimer's mouse retina well before onset of cognitive decline. *ACS chemical neuroscience* 2014;6:306-15.
38. More SS, Beach JM, Vince R. Early Detection of Amyloidopathy in Alzheimer's Mice by Hyperspectral Endoscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57:3231-8.
39. Blanks JC, Schmidt SY, Torigoe Y, Porrello KV, Hinton DR, Blanks RH. Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL. *Neurobiol Aging* 1996;17:385-95.
40. Gunes A, Demirci S, Tok L, Tok O, Demirci S. Evaluation of retinal nerve fiber layer thickness in Alzheimer disease using spectral-domain optical coherence tomography. *Turk J Med Sci* 2015;45:1094-7.

41. Salobar-Garcia E, Hoyas I, Leal M, et al. Analysis of Retinal Peripapillary Segmentation in Early Alzheimer's Disease Patients. *Biomed Res Int* 2015;2015:636548.
42. Cheung CY, Ong YT, Hilal S, et al. Retinal ganglion cell analysis using high-definition optical coherence tomography in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015;45:45-56.
43. Eraslan M, Cerman E, Cekic O, et al. Neurodegeneration in ocular and central nervous systems: optical coherence tomography study in normal-tension glaucoma and Alzheimer disease. *Turk J Med Sci* 2015;45:1106-14.
44. Larrosa JM, Garcia-Martin E, Bambo MP, et al. Potential new diagnostic tool for Alzheimer's disease using a linear discriminant function for Fourier domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:3043-51.
45. Moschos MM, Markopoulos I, Chatziralli I, et al. Structural and functional impairment of the retina and optic nerve in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2012;9:782-8.
46. Kesler A, Vakhapova V, Korczyn AD, Naftaliev E, Neudorfer M. Retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 2011;113:523-6.
47. Lu Y, Li Z, Zhang X, et al. Retinal nerve fiber layer structure abnormalities in early Alzheimer's disease: evidence in optical coherence tomography. *Neurosci Lett* 2010;480:69-72.
48. Jindahra P, Hedges TR, Mendoza-Santiesteban CE, Plant GT. Optical coherence tomography of the retina: applications in neurology. *Curr Opin Neurol* 2010;23:16-23.
49. Paquet C, Boissonnot M, Roger F, Dighiero P, Gil R, Hugon J. Abnormal retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2007;420:97-9.
50. Berisha F, Feke GT, Trempe CL, McMeel JW, Schepens CL. Retinal abnormalities in early Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2285-9.
51. Iseri PK, Altinas O, Tokay T, Yuksel N. Relationship between cognitive impairment and retinal morphological and visual functional abnormalities in Alzheimer disease. *J Neuroophthalmol* 2006;26:18-24.
52. Cunha JP, Proenca R, Dias-Santos A, et al. OCT in Alzheimer's disease: thinning of the RNFL and superior hemiretina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017;255:1827-35.
53. Kwon JY, Yang JH, Han JS, Kim DG. Analysis of the Retinal Nerve Fiber Layer Thickness in Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment. *Korean J Ophthalmol* 2017;31:548-56.
54. Kirbas S, Turkyilmaz K, Anlar O, Tufekci A, Durmus M. Retinal nerve fiber layer thickness in patients with Alzheimer disease. *J Neuroophthalmol* 2013;33:58-61.
55. Kromer R, Serbecic N, Hausner L, Froelich L, Aboul-Enein F, Beutelspacher SC. Detection of Retinal Nerve Fiber Layer Defects in Alzheimer's Disease Using SD-OCT. *Frontiers in psychiatry* 2014;5:22-.
56. Golzan SM, Goozee K, Georgevsky D, et al. Retinal vascular and structural changes are associated with amyloid burden in the elderly: ophthalmic biomarkers of preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2017;9:13.
57. Garcia-Martin E, Bambo MP, Marques ML, et al. Ganglion cell layer measurements correlate with disease severity in patients with Alzheimer's disease. *Acta Ophthalmol* 2016;94:e454-9.
58. Bayhan HA, Aslan Bayhan S, Celikbilek A, Tanik N, Gurdal C. Evaluation of the chorioretinal thickness changes in Alzheimer's disease using spectral-domain optical coherence tomography. *Clin Exp Ophthalmol* 2015;43:145-51.
59. Marziani E, Pomati S, Ramolfo P, et al. Evaluation of retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer thickness in Alzheimer's disease using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:5953-8.
60. Oktem EO, Derle E, Kibaroglu S, Oktem C, Akkoyun I, Can U. The relationship between the degree of cognitive impairment and retinal nerve fiber layer thickness. *Neurol Sci* 2015;36:1141-6.
61. Bambo MP, Garcia-Martin E, Gutierrez-Ruiz F, et al. Analysis of optic disk color changes in Alzheimer's disease: a potential new biomarker. *Clin Neurol Neurosurg* 2015;132:68-73.
62. Polo V, Rodrigo MJ, Garcia-Martin E, et al. Visual dysfunction and its correlation with retinal changes in patients with Alzheimer's disease. *Eye (Lond)* 2017;31:1034-41.

63. Gao L, Liu Y, Li X, Bai Q, Liu P. Abnormal retinal nerve fiber layer thickness and macula lutea in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Arch Gerontol Geriatr* 2015;60:162-7.
64. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Koronyo Y, et al. Melanopsin retinal ganglion cell loss in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2016;79:90-109.
65. Liguori C, Romigi A, Nuccetelli M, et al. Orexinergic system dysregulation, sleep impairment, and cognitive decline in Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 2014;71:1498-505.
66. Ascaso FJ, Cruz N, Modrego PJ, et al. Retinal alterations in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an optical coherence tomography study. *J Neurol* 2014;261:1522-30.
67. Gimenez-Castejon D, Gomez-Gallego M, Martinez-Martinez ML, Dudekova M, Lajara-Blesa J. [How far reaches earliness of optical coherence tomography in cognitive impairment]. *Rev Neurol* 2016;63:5-10.
68. Trebbastoni A, D'Antonio F, Bruscolini A, et al. Retinal nerve fibre layer thickness changes in Alzheimer's disease: Results from a 12-month prospective case series. *Neurosci Lett* 2016;629:165-70.
69. Ferrari L, Huang SC, Magnani G, Ambrosi A, Comi G, Leocani L. Optical Coherence Tomography Reveals Retinal Neuroaxonal Thinning in Frontotemporal Dementia as in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2017;56:1101-7.
70. Kurna SA, Akar G, Altun A, Agirman Y, Gozke E, Sengor T. Confocal scanning laser tomography of the optic nerve head on the patients with Alzheimer's disease compared to glaucoma and control. *Int Ophthalmol* 2014;34:1203-11.
71. Lad EM, Mukherjee D, Stinnett SS, et al. Evaluation of inner retinal layers as biomarkers in mild cognitive impairment to moderate Alzheimer's disease. *PLoS One* 2018;13:e0192646.
72. Gharbiya M, Trebbastoni A, Parisi F, et al. Choroidal thinning as a new finding in Alzheimer's disease: evidence from enhanced depth imaging spectral domain optical coherence tomography. *J Alzheimers Dis* 2014;40:907-17.
73. Pillai JA, Bermel R, Bonner-Jackson A, et al. Retinal Nerve Fiber Layer Thinning in Alzheimer's Disease: A Case-Control Study in Comparison to Normal Aging, Parkinson's Disease, and Non-Alzheimer's Dementia. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2016;31:430-6.
74. Uchida A, Pillai JA, Bermel R, et al. Outer Retinal Assessment Using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography in Patients With Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59:2768-77.
75. Lee CS, Larson EB, Gibbons LE, et al. Associations between recent and established ophthalmic conditions and risk of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 2019;15:34-41.
76. Frost S, Kanagasingam Y, Sohrabi H, et al. Pupil response biomarkers for early detection and monitoring of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2013;10:931-9.
77. Cheung CY, Ong YT, Ikram MK, et al. Microvascular network alterations in the retina of patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014;10:135-42.
78. Williams MA, McGowan AJ, Cardwell CR, et al. Retinal microvascular network attenuation in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)* 2015;1:229-35.
79. Jiang H, Liu Y, Wei Y, et al. Impaired retinal microcirculation in patients with Alzheimer's disease. *PLoS One* 2018;13:e0192154.
80. Lee MJ, Deal JA, Ramulu PY, Sharrett AR, Abraham AG. Prevalence of Retinal Signs and Association With Cognitive Status: The ARIC Neurocognitive Study. *J Am Geriatr Soc* 2019.
81. Trebbastoni A, Marcelli M, Mallone F, et al. Attenuation of Choroidal Thickness in Patients With Alzheimer Disease: Evidence From an Italian Prospective Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2017;31:128-34.
82. Bulut M, Yaman A, Erol MK, et al. Choroidal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's type dementia. *Journal of ophthalmology* 2016;2016.
83. Bulut M, Kurtulus F, Gozkaya O, et al. Evaluation of optical coherence tomography angiographic findings in Alzheimer's type dementia. *Br J Ophthalmol* 2018;102:233-7.

84. O'Bryhim BE, Apte RS, Kung N, Coble D, Van Stavern GP. Association of Preclinical Alzheimer Disease With Optical Coherence Tomographic Angiography Findings Association of Preclinical Alzheimer Disease With OCT Angiographic Findings Association of Preclinical Alzheimer Disease With OCT Angiographic Findings. *JAMA Ophthalmology* 2018;136:1242-8.
85. Frost S, Kanagasingam Y, Sohrabi H, et al. Retinal vascular biomarkers for early detection and monitoring of Alzheimer's disease. *Translational psychiatry* 2013;3:e233.
86. Csincsik L, MacGillivray TJ, Flynn E, et al. Peripheral Retinal Imaging Biomarkers for Alzheimer's Disease: A Pilot Study. *Ophthalmic Res* 2018;59:182-92.
87. Ukalovic K, Cao S, Lee S, et al. Drusen in the Peripheral Retina of the Alzheimer's Eye. *Curr Alzheimer Res* 2018;15:743-50.
88. Ho CY, Troncoso JC, Knox D, Stark W, Eberhart CG. Beta-amyloid, phospho-tau and alpha-synuclein deposits similar to those in the brain are not identified in the eyes of Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Brain Pathol* 2014;24:25-32.
89. Frost S, Kanagasingam Y, Macaulay L, et al. Retinal amyloid fluorescence imaging predicts cerebral amyloid burden and alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 2014;10:P234-P5.
90. Jiang J, Wang H, Li W, Cao X, Li C. Amyloid Plaques in Retina for Diagnosis in Alzheimer's Patients: a Meta-Analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2016;8.
91. Koronyo Y, Biggs D, Barron E, et al. Retinal amyloid pathology and proof-of-concept imaging trial in Alzheimer's disease. *JCI Insight* 2017;2.
92. Coppola G, Di Renzo A, Ziccardi L, et al. Optical coherence tomography in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *PloS one* 2015;10:e0134750.
93. Thomson KL, Yeo JM, Waddell B, Cameron JR, Pal S. A systematic review and meta-analysis of retinal nerve fiber layer change in dementia, using optical coherence tomography. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 2015;1:136-43.
94. He XF, Liu YT, Peng C, Zhang F, Zhuang S, Zhang JS. Optical coherence tomography assessed retinal nerve fiber layer thickness in patients with Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Int J Ophthalmol* 2012;5:401-5.
95. Cordeiro MF, Guo L, Coxon KM, et al. Imaging multiple phases of neurodegeneration: a novel approach to assessing cell death in vivo. *Cell Death Dis* 2010;1:e3.
96. Cordeiro MF, Guo L, Luong V, et al. Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101:13352-6.
97. Liao H, Zhu Z, Peng Y. Potential Utility of Retinal Imaging for Alzheimer's Disease: A Review. *Frontiers in aging neuroscience* 2018;10.
98. Yap TE, Donna P, Almonte MT, Cordeiro MF. Real-Time Imaging of Retinal Ganglion Cell Apoptosis. *Cells* 2018;7.
99. Cordeiro MF, Normando EM, Cardoso MJ, et al. Real-time imaging of single neuronal cell apoptosis in patients with glaucoma. *Brain* 2017;140:1757-67.
100. Stefánsson E, Olafsdottir OB, Einarsdottir AB, et al. Retinal oximetry discovers novel biomarkers in retinal and brain diseases. *Investigative ophthalmology & visual science* 2017;58: BIO227-BIO33.
101. Einarsdottir AB, Hardarson SH, Kristjansdottir JV, Bragason DT, Snaedal J, Stefansson E. Retinal oximetry imaging in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2016;49:79-83.
102. Olafsdottir OB, Saevarsdottir HS, Hardarson SH, et al. Retinal oxygen metabolism in patients with mild cognitive impairment. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 2018;10:340-5.
103. Jentsch S, Schweitzer D, Schmidtke KU, et al. Retinal fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy measures depend on the severity of Alzheimer's disease. *Acta Ophthalmol* 2015;93:e241-7.
104. Krasodomska K, Lubinski W, Potemkowski A, Honczarenko K. Pattern electroretinogram (PERG) and pattern visual evoked potential (PVEP) in the early stages of Alzheimer's disease. *Doc Ophthalmol* 2010;121:111-21.

105. Frederikse PH, Farnsworth P, Zigler JS, Jr. Thiamine deficiency in vivo produces fiber cell degeneration in mouse lenses. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:703-7.
106. Frederikse PH, Zigler JS, Jr. Presenilin expression in the ocular lens. *Curr Eye Res* 1998;17:947-52.
107. Li G, Percontino L, Sun Q, Qazi AS, Frederikse PH. Beta-amyloid secretases and beta-amyloid degrading enzyme expression in lens. *Mol Vis* 2003;9:179-83.
108. Frederikse PH, Garland D, Zigler JJ, Piatigorsky J. Oxidative stress increases production of beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid (A β) in mammalian lenses, and A β has toxic effects on lens epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:10169-74.
109. Frederikse PH, Zigler SJ, Jr., Farnsworth PN, Carper DA. Prion protein expression in mammalian lenses. *Curr Eye Res* 2000;20:137-43.
110. Frederikse PH, Ren X-O. Lens defects and age-related fiber cell degeneration in a mouse model of increased A β PP gene dosage in Down syndrome. *The American journal of pathology* 2002;161:1985-90.
111. Goldstein LE, Muffat JA, Cherny RA, et al. Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. *Lancet* 2003;361:1258-65.
112. Tian T, Zhang B, Jia Y, Li Z. Promise and challenge: the lens model as a biomarker for early diagnosis of Alzheimer's disease. *Dis Markers* 2014;2014:826503.
113. Moncaster JA, Pineda R, Moir RD, et al. Alzheimer's disease amyloid-beta links lens and brain pathology in Down syndrome. *PLoS One* 2010;5:e10659.
114. Bei L, Shui YB, Bai F, Nelson SK, Van Stavern GP, Beebe DC. A test of lens opacity as an indicator of preclinical Alzheimer Disease. *Exp Eye Res* 2015;140:117-23.
115. Kerbage C, Sadowsky C, Jennings D, Cagle G, Hartung P. Alzheimer's disease diagnosis by detecting exogenous fluorescent signal of ligand bound to Beta amyloid in the lens of human eye: an exploratory study. *Frontiers in neurology* 2013;4:62.
116. Kerbage C, Sadowsky CH, Tariot PN, et al. Detection of Amyloid beta Signature in the Lens and Its Correlation in the Brain to Aid in the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2015;30:738-45.
117. Michael R, Otto C, Lenferink A, et al. Absence of amyloid-beta in lenses of Alzheimer patients: a confocal Raman microspectroscopic study. *Exp Eye Res* 2014;119:44-53.
118. Michael R, Rosandic J, Montenegro GA, et al. Absence of beta-amyloid in cortical cataracts of donors with and without Alzheimer's disease. *Exp Eye Res* 2013;106:5-13.
119. Williams EA, McGuone D, Frosch MP, Hyman BT, Laver N, Stemmer-Rachamimov A. Absence of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes in Eyes of Subjects With Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2017;76:376-83.
120. Prakasam A, Muthuswamy A, Ablonczy Z, et al. Differential accumulation of secreted A β PP metabolites in ocular fluids. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010;20:1243-53.
121. Bayer AU, Keller ON, Ferrari F, Maag KP. Association of glaucoma with neurodegenerative diseases with apoptotic cell death: Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Am J Ophthalmol* 2002;133:135-7.
122. Janciauskiene S, Krakau T. Alzheimer's peptide and serine proteinase inhibitors in glaucoma and exfoliation syndrome. *Documenta ophthalmologica* 2003;106:215-23.
123. Janciauskiene S, Westin K, Grip O, Krakau T. Detection of Alzheimer peptides and chemokines in the aqueous humor. *European journal of ophthalmology* 2011;21:104-11.
124. Lesiewska H, Malukiewicz G, Bagniewska-Iwanier M, Mańkowska-Cyl A, Sypniewska G. Amyloid β peptides and cognitive functions in patients with pseudoexfoliation syndrome. *Current eye research* 2016;41:662-6.
125. Bach-Holm D, Kessing SV, Mogensen U, Forman JL, Andersen PK, Kessing LV. Normal tension glaucoma and Alzheimer disease: comorbidity? *Acta Ophthalmol* 2012;90:683-5.
126. Ou Y, Grossman DS, Lee PP, Sloan FA. Glaucoma, Alzheimer disease and other dementia: a longitudinal analysis. *Ophthalmic Epidemiol* 2012;19:285-92.

127. Keenan TD, Goldacre R, Goldacre MJ. Associations between primary open angle glaucoma, Alzheimer's disease and vascular dementia: record linkage study. *Br J Ophthalmol* 2015;99:524-7.
128. Wostyn P, De Groot V, Van Dam D, Audenaert K, Killer HE, De Deyn PP. The Glymphatic Hypothesis of Glaucoma: A Unifying Concept Incorporating Vascular, Biomechanical, and Biochemical Aspects of the Disease. *Biomed Res Int* 2017;2017:5123148.
129. Kallo G, Emri M, Varga Z, et al. Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers. *PLoS One* 2016;11:e0158000.
130. Granholm E, Morris S, Galasko D, Shults C, Rogers E, Vukov B. Tropicamide effects on pupil size and pupillary light reflexes in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Int J Psychophysiol* 2003;47:95-115.
131. Ferrario E, Molaschi M, Villa L, Varetto O, Bogetto C, Nuzzi R. Is videopupillography useful in the diagnosis of Alzheimer's disease? *Neurology* 1998;50:642-4.
132. Kurz A, Marquard R, Fremke S, Leipert KP. Pupil dilation response to tropicamide: a biological test for Alzheimer's disease? *Pharmacopsychiatry* 1997;30:12-5.
133. Growdon JH, Graefe K, Tennis M, Hayden D, Schoenfeld D, Wray SH. Pupil dilation to tropicamide is not specific for Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1997;54:841-4.
134. Graff-Radford NR, Lin SC, Brazis PW, et al. Tropicamide eyedrops cannot be used for reliable diagnosis of Alzheimer's disease. *Mayo Clin Proc* 1997;72:495-504.
135. FitzSimon JS, Waring SC, Kokmen E, McLaren JW, Brubaker RF. Response of the pupil to tropicamide is not a reliable test for Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1997;54:155-9.
136. Robles A, Tourino R, Sesar A, Suarez P, Noya M. [Experience with pupil tropicamide test in Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* 1996;24:65-8.
137. Loupe DN, Newman NJ, Green RC, et al. Pupillary response to tropicamide in patients with Alzheimer disease. *Ophthalmology* 1996;103:495-503.
138. Litvan I, FitzGibbon EJ. Can tropicamide eye drop response differentiate patients with progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease from healthy control subjects? *Neurology* 1996;47:1324-6.
139. Fotiou F, Fountoulakis KN, Tsolaki M, Goulas A, Palikaras A. Changes in pupil reaction to light in Alzheimer's disease patients: a preliminary report. *Int J Psychophysiol* 2000;37:111-20.
140. Fotiou DF, Brozou CG, Haidich AB, et al. Pupil reaction to light in Alzheimer's disease: evaluation of pupil size changes and mobility. *Aging Clin Exp Res* 2007;19:364-71.
141. Bittner DM, Wieseler I, Wilhelm H, Riepe MW, Muller NG. Repetitive pupil light reflex: potential marker in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2014;42:1469-77.
142. Granholm EL, Panizzon MS, Elman JA, et al. Pupillary Responses as a Biomarker of Early Risk for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2017;56:1419-28.
143. Elman JA, Panizzon MS, Hagler DJ, Jr., et al. Task-evoked pupil dilation and BOLD variance as indicators of locus coeruleus dysfunction. *Cortex* 2017;97:60-9.
144. Campbell MCW Methods for imaging amyloid beta in the retina of the eye in association with Alzheimer's disease. US Patent 9149184B2 issued October 6 2015
145. Amoneta Diagnosis SAS (2017). A Multi-centre Proof-of-performance Clinical Study to Validate Blood-based Biomarker Candidates for the Diagnosis of Alzheimer's Disease ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03030586 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03030586>
146. Keel, S. and van Wijngaarden, P. (2019), The eye in AI: artificial intelligence in ophthalmology. *Clin. Experiment. Ophthalmol.*, 47: 5-6. doi:[10.1111/ceo.13435](https://doi.org/10.1111/ceo.13435)

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL

