

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



**TESE DE DOUTORADO**

CALIBRE VASCULAR RETINIANO E A PRESSÃO ARTERIAL MEDIDA POR  
MONITORAMENTO AMBULATORIAL DA PRESSÃO ARTERIAL

HELENA MESSINGER PAKTER

Orientador: Prof. Dra. Sandra Costa Fuchs

Porto Alegre, julho de 2010.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



**TESE DE DOUTORADO**

CALIBRE VASCULAR RETINIANO E A PRESSÃO ARTERIAL MEDIDA POR  
MONITORAMENTO AMBULATORIAL DA PRESSÃO ARTERIAL

HELENA MESSINGER PAKTER

**Orientador: Prof.** Dra. Sandra Costa Fuchs

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, Brasil.

**2010**

**P152c** Pakter, Helena Messinger

Calibre vascular retiniano e a pressão arterial medida por monitoramento ambulatorial da pressão arterial / Helena Messinger Pakter ; orient. Sandra Costa Fuchs. – 2010.

124 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Monitorização ambulatorial da pressão arterial 2. Vasos retinianos 3. Pressão arterial 4. Validação de programas de computador 5. Calibragem I.  
Fuchs, Sandra Cristina Pereira Costa II. Título.

NLM: WW 270

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Defesa Preliminar:**

Prof. Dr. Jair Ferreira Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Miguel Gus Programa de Pós-graduação em Cardiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Profa. Dra. Leila B. Moreira Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **Defesa Final:**

Prof. Dr. Miguel Gus, Programa de Pós-graduação em Cardiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Hilton de Castro Chaves Junior, Programa de Pós-graduação em Cardiologia, Universidade Federal de Pernambuco.

Profa. Dr. João Borges Fortes Filho, Professor Oftalmologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Dra. Sandra C. Fuchs, pela sua dedicação e disponibilidade. Pelo seu exemplo de determinação e profissionalismo e também por sua amizade.

A todos os professores da pós-graduação em epidemiologia por terem me transmitidos os ensinamentos necessários para que hoje eu possa estar finalizando esta tese.

Ao apoio recebido do Grupo Hospitalar Conceição para realização deste doutorado.

Agradeço também ao Drs. Flávio Fuchs e Marcelo Maestri pelas brilhantes sugestões em nossos artigos.

Agradeço meu sogro, Dr. Bóris Pakter, pelos seus sábios ensinamentos desde o início da minha carreira médica, pelo apoio que me deu para que eu pudesse realizar este doutorado e por seu exemplo de dedicação e carinho com os pacientes.

Em especial agradeço ao meu marido Renato por seu carinho, paciência e sábios conselhos, e aos meus pais Vera e José Alfredo pelo seu amor incondicional e exemplo de vida.

Enfim, sou grata a todos os amigos e familiares que me apoiaram neste projeto.

## DEDICATÓRIA

À minhas filhas Marina, 7 anos, e Georgia, 3 anos.

Em certo dia de estudo minha filha Marina me chamou para brincar, e eu disse:

- Agora posso ir, eu acabei.

Com olhos brilhantes ela me perguntou:

- Acabou para sempre?

Espero que ela e sua mana Georgia possam um dia também sentir que, felizmente, quanto mais sabemos mais temos para estudar.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
APRESENTAÇÃO.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 AVALIAÇÃO RETINIANA: ALTERAÇÕES MICROVASCULARES.....	17
2.1.1 FISIOPATOLOGIA DAS ALTERAÇÕES RETINIANAS RELACIONADAS À HIPERTENSÃO:.....	17
2.1.2 ALTERAÇÕES VASCULARES RETINIANAS E DOENÇA CARDIOVASCULAR ..	18
2.1.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS CALIBRES VASCULARES RETINIANOS ..	18
2.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	29
2.2.1 MEDIDA CASUAL DA PRESSÃO ARTERIAL.....	29
2.2.2 MONITORIZAÇÃO AMBULATORIAL DA PRESSÃO ARTERIAL .....	30
2.2.3 PAPEL DA MAPA NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA EM PACIENTES HIPERTENSOS .....	33
2.2.4 PARÂMETROS DA MAPA .....	35
2.3 ANÁLISE DA RITMICIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL .....	36
2.3.1 VARIAÇÃO CIRCADIANA DA PRESSÃO ARTERIAL E CRONOBIOLOGIA.....	37
2.3.2 CONCEITOS FUNDAMENTAIS DA CRONOBIOLOGIA.....	37
3 OBJETIVOS .....	41
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
5 ARTIGO 1.....	49
6 ARTIGO 2.....	62
7 ARTIGO 3.....	81
8 ARTIGO 4.....	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
ANEXO I.....	113
ANEXO II.....	116

## ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPM	<i>Ambulatory Blood Pressure Monitoring</i>
AF	Angiografias Fluoresceínicas
ARIC	<i>Atherosclerosis Risk In Communities Study</i>
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVR	<i>Arteriolar-to-Venular Ratio</i>
BMES	<i>Blue Mountain Eye Study</i>
BP	<i>Blood Pressure</i>
CHS	<i>Cardiovascular Health Study</i>
CCI	Coeficiente de Correlação Intraclasse
CR	<i>Color Retinographies</i>
CR	<i>Circadian Rhythm</i>
DCV	Doença Cardiovascular
DIC	Doença Isquêmica do Coração
DP	Desvio Padrão
dpi	<i>Dots Per Inch</i>
EACR	Equivalente da Artéria Central da Retina
EVCR	Equivalente da Veia Central da Retina
FA	<i>Fluorescent Angiographies</i>
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HbG	Hemoglobina Glicosilada
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
hsCRP	<i>High-Sensitivity C-Reactive Protein</i>
HVE	Hipertrofia Ventricular Esquerda
IC	Intervalo de Confiança
ICC	<i>Intraclass Correlation Coefficient</i>
IFG	<i>Impaired Fasting Glucose</i>
IG	Índice Glicêmico
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
IMVE	Índice de Massa Ventricular Esquerda
μm/px	Micra por Pixels
MAPA	Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial
MESA	<i>The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis</i>
MESOR	<i>Midline Estimated Statistic Of Rhythm</i>
mmHg	Milímetros de Mercúrio
NFG	<i>Normal Fasting Glucose</i>
OD	Olho Direito



OD	<i>Oculum Dexter</i> - Latin para "Right Eye"
OE	Olho Esquerdo
OS	<i>Oculum Sinister</i> - Latin para "Left Eye"
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAI	<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>
PAS	Pressão Arterial Sistólica
RAS	<i>Retinal Analyser System</i>
RAV	Razão Arteríolo-Venular
RC	Razão de Chances
RC	Retinografia Colorida
RC	Ritmo Circadiano
RH	Retinopatia Hipertensiva
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RR	Risco Relativo
sICAM-1	<i>Soluble Intercellular Adhesion Molecule</i>
TG	Triglicérides
VSG	Velocidade de Sedimentação Glomerular

## RESUMO

É bem conhecido que alterações vasculares iniciam como um processo silencioso e assintomático. A identificação precoce de anormalidades vasculares na retina em pacientes assintomáticos pode permitir a detecção de pacientes em risco de desenvolver DCV. Por prover visualização direta do leito vascular, a retina pode ser estudada não invasivamente mostrando o grau de acometimento da microcirculação.

Avanços nas técnicas de fotografia retiniana e de análise digital de imagem tem permitido a mensuração objetiva de alterações vasculares da retina. Com isso, é possível quantificar anormalidades na microvasculatura retiniana, imprescindível para o estudo da fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica, bem como para a avaliação da associação com doença cardiovascular.

Um software desenvolvido pela autora desta tese e colaboradores é capaz de medir calibre de arteríolas e vênulas de retinografias digitalizadas. Esse software, nomeado Retinal Analyser System (RAS), foi atualizado e houve a inclusão e testagem de um fator de escala ou calibração, apresentado no Artigo 1 dessa tese.

Os métodos de análise de imagens da retina utilizados para medir calibre dos vasos retinianos não determinam exatamente o que está sendo medido. Assim, havia necessidade de investigar se o calibre medido no software RAS corresponde ao lúmen vascular somente ou se inclui a parede vascular. O Artigo 2 dessa tese apresenta a comparação de medidas de calibre de vasos retinianos, em retinografias coloridas com angiografias fluoresceínicas. Nesse artigo concluímos que, como as diferenças encontradas entre os dois métodos foram muito pequenas, o método microdensitométrico mede o lúmen vascular.

Os calibres vasculares retinianos avaliados quantitativamente por métodos digitalizados tem mostrado uma associação significativa com incidência e gravidade da hipertensão arterial casual. No entanto, nas últimas décadas, tem sido discutido o valor da medida casual da pressão arterial para fins prognósticos. Em função da variação contínua da pressão arterial, de momento a momento, de acordo com as atividades do indivíduo, novos métodos podem complementar a avaliação através de medidas repetidas da pressão arterial, permitindo a detecção da pressão arterial usual.

Tendo em vista essas considerações, o Artigo 3 dessa tese avaliou a associação entre os diferentes parâmetros da pressão arterial, medida pela MAPA, e os calibres vasculares retinianos. A relação entre pressão arterial e calibre arteriolar e venular da retina no momento da obtenção retinografia também foi estudada.

Demonstramos que a pressão diastólica média das 24 horas, da vigília e do sono teve associação inversa e significativa com calibre arteriolar e razão arterio-venosa, mas não com calibre venular. A pressão arterial medida na hora da retinografia não mostrou associação com o calibre dos vasos retinianos. Assim concluímos que a associação entre o calibre arteriolar dos vasos retinianos e a pressão arterial não é influenciada pela variação instantânea da pressão arterial e, provavelmente, depende de lesões histológicas da parede arteriolar secundária à hipertensão sustentada.

Através da MAPA também é possível avaliarmos a variação temporal da pressão arterial ao longo de um período de 24 horas, e assim estudar o ritmo circadiano e a ritimicidade da pressão arterial. Uma maneira de analisar a ritimicidade da pressão arterial é através do método Cosinor, um método de análise de regressão periódica, baseada na adaptação da função do cosseno, para valores da pressão arterial com período de 24 horas. O método Cosinor gera, em cada elemento (indivíduo ou população), os seguintes parâmetros de validação do ritmo circadiano: MESOR (sigla em inglês para média do ritmo ajustada estatisticamente), acrofase e amplitude.

O estudo do ritmo circadiano da pressão arterial, avaliado pela análise de cosinor, e sua associação com os calibres vasculares retinianos, resultou no artigo 4 dessa tese. Nesse artigo, mostramos que o MESOR associa-se significativamente e inversamente com calibre arteriolar, com uma magnitude de 0.8 a 1 micron de redução no calibre para um aumento de 10 mmHg do MESOR da pressão arterial. O calibre venular não mostrou associação com o MESOR. Também usamos a análise de Cosinor para população e avaliamos as diferenças nos ritmos da pressão arterial entre as populações do primeiro e dos demais quintis de calibre vascular. Através desta análise observamos que amplitude e acrofase da pressão arterial são estatisticamente diferente entre as populações do primeiro e demais quintis de calibre venoso, mas não arteriolar. Em resumo, enquanto o MESOR está associado ao calibre arteriolar, a amplitude e a acrofase estão associadas ao calibre venular.

Concluindo, essa tese mostra, através de seus 4 artigos, a aplicação do software RAS para medida de calibres vasculares retinianos e a associação dessas medidas com pressão arterial, em uma população de pacientes hipertensos. A associação entre o calibre vascular retiniano, a pressão arterial medida 24 horas e o seu ritmo, demonstrada nessa tese, fortalece a hipótese que a avaliação da microvasculatura retiniana pode ser um marcador clínico importante de lesão em órgão.

## **ABSTRACT**

It is well known that vascular changes begin as a silent and asymptomatic process. Early identification of retinal vascular abnormalities in asymptomatic patients may allow the detection of patients at risk. By providing unique visualization of the vascular bed, the retina can be studied non-invasively and show the degree of microcirculation involvement.

Advances in techniques of retinal photography and digital image analysis have allowed objective measurement of retinal vascular changes. Thus, it is possible to quantify abnormalities in the retinal microvasculature, essentially to study hypertension pathophysiology, and to assess its association to cardiovascular disease.

Software developed by our research group is able to measure the caliber of arterioles and venules of digitized fundus. This software, named Retinal Analyzer System (RAS), has been updated by including and testing a scale factor, presented in Article 1 of this thesis.

The current methods of image analysis used to measure the caliber of retinal vessels do not determine exactly what is being measured. Thus there was need to investigate whether the caliber measured in RAS software corresponds to the vascular lumen only or whether it includes the vascular wall. Article 2 of this thesis presents a comparison of the measurements of retinal vessels calibers in color fundus photography to those in fluorescein angiography. In this article we show that the differences found between the two methods were very small, and concluded that the microdensitometry method measures mainly the vascular lumen.

The retinal vascular calibers measured quantitatively by microdensitometric methods have shown a significant association with incidence and severity of hypertension. However, studies evaluating these associations are based on casual blood pressure and, in recent decades, it has been discussed the value of casual blood pressure measurement. In light of continuous variation in blood pressure from moment to moment, according to the individual's activities, new methods can complement the assessments through repeated measurements of blood pressure, allowing the detection of usual blood pressure.

Given these considerations, Article 3 of this thesis examined the association between different parameters of the blood pressure measured by ABPM, and retinal vascular caliber. The relationship between blood pressure at the time of retinography acquisition and retinal arteriolar and venular caliber was also studied. We show that

the mean 24 hours, daytime and night time diastolic blood pressure were significantly and inversely associated with arteriolar caliber and arteriovenous ratio, but not with venular caliber. The pressure measured at the time of acquisition of the fundus showed no association with the caliber of retinal vessels, thus the association between arteriolar retinal vessels caliber and blood pressure is not influenced by instantaneous variation of blood pressure and probably depends of histological damage of arteriolar wall secondary to sustained hypertension.

Using ABPM is also possible to evaluate the temporal variation of blood pressure over a period of 24 hours, and then study the circadian rhythm of blood pressure. One way to analyze the blood pressure rhythm is using the Cosinor method, a method of periodic regression analysis, based on the adaptation of the cosine function, for values of blood pressure with 24-hour period. The method Cosinor generates the following validation parameters of the circadian rhythm: MESOR (acronym for "Midline Estimated Statistic Of Rhythm"), acrophase and amplitude.

The study of circadian rhythm of blood pressure, as assessed by analysis COSINOR and its association with retinal vascular caliber, resulted in Article 4 of this thesis. In this paper we show that MESOR is associated significantly and inversely with arteriolar caliber, with a magnitude of 0.8 to 1 micron reduction to an increase of 10 mmHg of blood pressure MESOR. The venular caliber was not associated with MESOR. We also use the Cosinor analysis to study differences in the rhythms of blood pressure among populations in the first quintile and the rest quintiles of vascular caliber. Through this analysis we found that amplitude and acrophase of blood pressure were statistically different between the populations of the first and the other quintiles of venous caliber, but not arterioles.

In conclusion, this thesis shows, through its four articles, the application of RAS software to measure retinal vascular caliber and the association of these measurements with blood pressure in a population of hypertensive patients. The association between retinal vascular calibers, blood pressure measured 24 hours and rhythm, as demonstrated in this thesis, strengthens the hypothesis that assessment of the retinal microvasculature may be an important clinical marker of organ damage.

## **APRESENTAÇÃO**

Este trabalho consiste na tese de doutorado intitulada "Associação entre calibre vascular retiniano e pressão arterial", do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O trabalho é apresentado em três partes, na ordem que segue:

1. Introdução, Revisão de Literatura e Objetivos
2. Artigos
3. Conclusões e Considerações Finais

## 1 INTRODUÇÃO

O olho, formado por um conjunto de estruturas transparentes (córnea, humor aquoso, lente e humor vítreo) é o único órgão do corpo humano (10) que permite a observação direta da microvasculatura, representando uma "janela natural". (15) O leito vascular do fundo de olho é constituído por vasos de pequeno calibre (arteríolas e vênulas) envolvidos no aumento da resistência vascular periférica, observada na hipertensão arterial sistêmica (HAS). Alterações na vasculatura retiniana têm sido identificadas como preditoras de hipertensão arterial (88;95), diabetes melitus (93) e doença arterial coronariana. (90)

As primeiras descrições do comprometimento ocular causado pela HAS datam de 1836, quando Richard Bright (6) observou o envolvimento ocular em pacientes com doença renal. Por volta de 1850, com a invenção do oftalmoscópio por Helmholtz (21), foi possível caracterizar as alterações oftalmológicas associadas a essa enfermidade. Seguiram-se as contribuições de Liebreich (34) e Marcus Gunn (19), em 1898, e, em 1930, Fishberg e Oppenheimer(16), utilizaram o termo neuro-retinopatia hipertensiva para descrever as alterações de fundo de olho em pacientes com HAS. Posteriormente, consagrou-se o termo retinopatia hipertensiva (RH).(86)

A retinopatia hipertensiva foi classificada por diversos autores sendo a classificações de Keith, Wagener e Barker a mais conhecida e utilizada.(28) Sinais retinianos microvasculares hipertensivos incluem uma gama de anormalidades, tais como estreitamento arteriolar focal e generalizado (53;72) entrecruzamento arterio-venoso(31), e retinopatia.(30;96) Esses sinais resultam da elevação da pressão arterial e possuem alterações histopatológicas retinianas correspondentes.

No entanto, embora muito importantes na época para identificar associações, esses estudos foram conduzidos em pacientes mais graves, selecionados em clínicas e foram avaliados por oftalmoscopia para identificar alterações nas paredes dos vasos, método que provou ter baixa reprodutibilidade.(12;38)

Os estudos mais recentes analisam imagens do fundo de olho através de análise digital, o que a torna análise mais precisa e reprodutível.(44) Com isso, é possível quantificar anormalidades na microvasculatura retiniana, imprescindível para o estudo da fisiopatologia da HAS, bem como para a avaliação da associação com doença cardiovascular (DCV).

Assim como a avaliação das alterações vasculares retinianas passou a ser mais precisa com a medida quantitativa dos calibres vasculares, a avaliação da pressão arterial também sofreu uma mudança de paradigma com a introdução da

monitorização ambulatorial da pressão arterial. A pressão arterial medida de forma casual tem sido questionada para fins prognósticos. Por serem mais reprodutíveis e estimar melhor a variável pressão arterial, os valores de pressão arterial, obtidos pela monitorização da pressão arterial ambulatorial, se correlacionam mais fortemente com lesões em órgãos-alvo e morbidade e mortalidade do que as medidas casuais da pressão arterial. Assim, a MAPA também deve ser incorporada nos estudos de associação entre calibres vasculares retinianos, pressão arterial e desfechos cardiovasculares.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 AVALIAÇÃO RETINIANA: ALTERAÇÕES MICROVASCULARES

Assim como os parâmetros qualitativos são importantes na avaliação do fundo de olho de pacientes hipertensos, como descrito classicamente nas classificações de Keith-Wagner-Barker(28) e Sheie (69), a avaliação quantitativa através da medida dos calibres vasculares passa a ter importância, principalmente na investigação de fatores de risco cardiovasculares em estudos populacionais. Para isso é importante o entendimento da fisiopatologia das alterações microvasculares relacionadas à hipertensão.

#### 2.1.1 FISIOPATOLOGIA DAS ALTERAÇÕES RETINIANAS RELACIONADAS À HIPERTENSÃO:

As alterações microvasculares retinianas podem ser descritas em 4 fases: vasoconstritora, exsudativa, esclerótica e nas complicações da fase esclerótica.(17;18;81)

Na fase vasoconstritora, há resposta vascular ao aumento da pressão arterial que se faz pelos mecanismos miogênicos e metabólicos. Isto porque, aparentemente, as arteríolas retinianas não apresentam inervação autônoma simpática. Essa fase pode evoluir diferentemente, caso a pressão arterial seja controlada ou não. Se a pressão arterial for controlada, a vasoconstrição pode desaparecer. Se a pressão arterial não for controlada, poderá ocorrer quebra das barreiras hemato-retiniana externa, representada pelo epitélio pigmentar da retina, e interna, representada pela vasculatura retiniana. Em resposta à pressão arterial elevada e sustentada, ocorre aumento do tônus vascular com redução do lúmen vascular.

A fase exsudativa segue a fase vasoconstritora. Nessa fase, ocorre o extravasamento de plasma e elementos figurados do sangue para dentro da retina. Na região macular poderá formar-se a estrela macular. O extravasamento de sangue, entremeando as fibras nervosas dá o aspecto das hemorragias em chama de vela. As manchas algodinosas surgem em decorrência da não perfusão das fibras nervosas.

A seguir temos a fase esclerótica com os vasos apresentando alteração da coloração, com aspecto de fio de cobre e fio de prata. Isto ocorre devido à esclerose hiperplásica, ao espessamento da túnica média e hiperplasia da túnica muscular. Com a progressão desse processo degenerativo, a parede dos vasos sofre hialinização com perda das células musculares.

A fase de complicação da esclerose pode se representar através de microaneurismas, macroaneurismas, oclusão da veia ou artéria central da retina, oclusão de ramos vasculares e formação de membrana epiretiniana.

### 2.1.2 ALTERAÇÕES VASCULARES RETINIANAS E DOENÇA CARDIOVASCULAR

É bem conhecido que alterações vasculares, incluindo aterosclerose, iniciam como um processo silencioso e assintomático. Assim, a identificação precoce de anormalidades vasculares em pacientes assintomáticos permite identificar pacientes em risco, antes que a hipertensão esteja instalada.(14) Para isso, os parâmetros vasculares devem ser preditivos de morbi-mortalidade cardiovascular. Vários métodos não invasivos têm sido introduzidos para detectar anormalidades da parede arteriolar que possam desencadear o processo aterosclerótico. É importante ressaltar que aterosclerose é uma doença vascular sistêmica que resulta em alterações funcionais e estruturais de toda a vasculatura arterial. Certas áreas vasculares, principalmente as circulações coronariana e cerebral, precipitam os eventos mais mórbidos, e a razão de progressão pode variar diferentemente nos leitos vasculares e em diferentes indivíduos. A circulação retiniana pode prover visualização única do leito vascular, que pode ser estudada não invasivamente.

Assim, devido ao grande impacto financeiro e social das doenças cardiovasculares (DCV) tem havido esforços para identificar fatores de risco destas doenças. Há, no momento, uma tendência de se mover do tratamento de doentes para o diagnóstico de DCV em pessoas assintomáticas. A prevenção primária do DCV tem sido focada na identificação de fatores de risco e na documentação da DCV precoce.

### 2.1.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS CALIBRES VASCULARES RETINIANOS

Avanço nas técnicas de fotografia retiniana e análise de imagem tem permitido a mensuração objetiva de alterações vasculares da retina. Vários métodos semi-automatizados, baseados em programas de computador de imagem provaram ser altamente precisos e reprodutíveis na avaliação in vivo de alterações da rede vascular retiniana.(52) Muitos desses métodos são classificados como microdensitométricos porque se baseiam em diferenças de densidade de pixels entre o fundo da retina e do interior do vaso permitindo detectar as bordas de arteríolas e vênulas. (64;91;92) Dessa forma, são, em grande parte, independentes do observador(52) e mais precisos para detectar o calibre das arteríolas e vênulas.(94) Em particular, a medida quantitativa do calibre vascular da retina tem auxiliado no conhecimento do significado clínico e o papel das influências sistêmicas, ambientais e fatores genéticos sobre a vasculatura retiniana.(74)

Vários estudos de base populacional têm apresentado o estreitamento vascular retiniano medido através destes métodos digitais, caracterizando um padrão relativamente consistente de associação entre diâmetro vascular retiniano e morbimortalidade cardiovascular. Os principais estudos estão sumarizados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação entre diâmetro vascular retiniano e hipertensão, doença cardiovascular, diabetes e mortalidade.

<b>Delimitação</b>	<b>População</b>	<b>Variáveis Retinianas</b>	<b>Variáveis Sistêmicas (ou desfecho)</b>	<b>Resumo dos achados principais</b>	<b>Referência</b>
Cohort	Base Populacional The Fungata Study Japão N= 581	Calibre vascular medido por método computadorizado e avaliação da presença ou ausência de outros sinais de retinopatia hipertensiva	Incidência de hipertensão	Incidência de hipertensão 34.3% em 5 anos. RC por diminuição de desvio padrão do calibre das arteríolas foi de 1.53 (95% CI: 1.08-2.18). Concluíram que estreitamento arteriolar retiniano aumenta o risco de desenvolver hipertensão em japoneses.	Tanabe, 2010 (78)
Meta-análise	Estudos relevantes MEDLINE e EMBASE (1950 - 2009) 6 elegíveis N= 22159	Calibre vascular medido por método computadorizado	Incidência de DCV	Alterações no calibre dos vasos (vênulas mais largas e arteríolas mais estreitas) estavam associadas com aumento de risco de DCV em mulheres (RC 1.16 [IC 95%, 1.06 to 1.26] por 20µm aumento do calibre venular e 1.17 [IC 95%, 1.07 to 1.28] por 20µm diminuição do calibre arteriolar), mas não em homens (RC 1.02 [IC, 0.94 to 1.10] por 20µm aumento calibre venular e 1.02 [IC, 0.95 to 1.10] por 20µm diminuição calibre arteriolar). Mulheres sem hipertensão ou diabetes tiveram uma razão de chance mais elevada.	McGeechan 2009 (40)
Cohort	Base populacional BME Study, Austrália N= 2897	Calibre vascular medido por método computadorizado	Índices glicêmicos Dieta pobre em fibras AVC	Altos índices glicêmicos e dietas pobres em fibras e cereais predizem maior morte por AVC e calibre venular retiniano aumentado. Sugerem que dieta com alto IG pode produzir defeito anatômico deletério na microvasculatura.	Kaushik, 2009 (25)

<b>Delineamento</b>	<b>População</b>	<b>Variáveis Retinianas</b>	<b>Variáveis Sistêmicas (ou desfecho)</b>	<b>Resumo dos achados principais</b>	<b>Referência</b>
Cohort	Base Populacional MESA Study Estados Unidos N= 2583	Calibre vascular medido por método computadorizado	Incidência de hipertensão	Menor diâmetro arteriolar retiniano e maior diâmetro venular relacionado ao aumento da incidência de hipertensão arterial [RC por diminuição de desvio padrão do calibre arteriolar foi 1,20 (95% IC 1,02 - 1,42) e RC por aumento de DP calibre venular 1,18 (95% IC 1,02 -1,37)]. Estreitamento arteriolar focal também relacionado ao aumento da incidência de hipertensão arterial (RC 1.80 95% IC 1,09 - 2,97).	Kawasaki, 2009 (26)
Cohort	Base populacional ARIC Study Estados Unidos N= 8794	Calibre vascular medido por método computadorizado	Fatores de risco para DCV	O principal determinante sistêmica do estreitamento do calibre arteriolar é a pressão arterial elevada, os determinantes de maior calibre venular são cigarro tabagismo, hipertensão, inflamação sistêmica, e obesidade.	Liew, 2008 (36)
Cohort	Base Populacional MESA Estados Unidos N = 5976	Calibre vascular medido por método computadorizado	Intolerância a glicose e Diabetes	Calibre arteriolar retiniano aumentou de 143.8 µm em indivíduos com glicemia normal, para 144.5 µm em intolerantes a glicose, e para 146.1 µm em diabéticos ( $P < 0.001$ para tendência). Calibre venular retiniano aumentou de 214.4 µm em normais, para 216.7 µm em intolerantes e 218.0 µm em diabéticos ( $P < 0.001$ para tendência). Diabéticos com retinopatia tinham calibre venular aumentado.	Nguyen, 2008 (45)

<b>Delineamento</b>	<b>População</b>	<b>Variáveis Retinianas</b>	<b>Variáveis Sistêmicas (ou desfecho)</b>	<b>Resumo dos achados principais</b>	<b>Referência</b>
Transversal	Base populacional The Singapura Malay Eye Study Singapura N = 3280	Calibre vascular medido por método computadorizado	Pressão arterial e outros fatores risco para DCV	Calibre arteriolar menor associado com PA atual mais alta e sexo masculino. ( $P < 0.001$ para ambos). Calibre venular aumentado associado com idade jovem, fumo atual, IMC elevado, HbG aumentada e baixo HDL colesterol ( $P < 0.012$ ). A associação do estreitamento arteriolar e PA foi mais forte em pessoas mais jovens do que em mais velhos, e em homem do que em mulheres ( $P < 0.001$ ).	Sun, 2008 (73)
Cohort	Base populacional BME Study, Austrália N= 2335 (5 anos) e N= 1952 (10 anos)	Calibre vascular medido por método computadorizado	Incidência de hipertensão grave e outros fatores risco para DCV	Participantes que posteriormente desenvolveram hipertensão grave tinham calibre retiniano mais estreito (187,0 vs 191,9 $\mu\text{m}$ , $p < 0,0001$ ). Após o ajuste para outros fatores de risco inicial calibre arteriolar foi associado ao risco aumentado de hipertensão grave. Concluíram que estreitamento estrutural em pequenas artérias e arteríolas antecede o aparecimento clínico de hipertensão grave.	Nguyen, 2008 (45;88)

<b>Delineamento</b>	<b>População</b>	<b>Variáveis Retinianas</b>	<b>Variáveis Sistêmicas (ou desfecho)</b>	<b>Resumo dos achados principais</b>	<b>Referência</b>
Transversal	Base Populacional BME Study	Comparação das informações preditivas dos modelos que usaram RAV com calibre arteriolar e venular isoladamente, medido por método computadorizado	Pressão arterial e contagem de leucócitos	Modelos usando calibre arteriolar e venular diretamente foram mais preditivos de desfechos sistêmico que modelos usando RAV. Recomenda o uso das variáveis em separado.	Liew, 2007 (35)
Cohort	Base Populacional CHS Estados Unidos N= 1992	Calibre vascular medido por método computadorizado	Incidência de DCV e AVC	Aqueles no maior quartil de calibre venular tiveram incidência maior de DCV (RR 3.0; 95% IC, 1.6-5.7, <i>P</i> tendência=.001) e de AVC (RR 2.2; 95% IC, 1.1-4.3; <i>P</i> tendência=.02), que aqueles no menor quartil.  Aqueles no menor quartil de calibre arteriolar tiveram mais DCV incidente (RR 2.0; 95% IC, 1.1-3.7; <i>P</i> =.03), mas não AVC (RR 1.1; 95% CI, 0.5-2.2; <i>P</i> =.73).  Concluíram que calibre venoso aumentado é independentemente associado com risco de DCV em idosos.	Wong, 2006 (90)

<b>Delineamento</b>	<b>População</b>	<b>Variáveis Retinianas</b>	<b>Variáveis Sistêmicas (ou desfecho)</b>	<b>Resumo dos achados principais</b>	<b>Referência</b>
Cohort	Base Populacional MESA, Estados Unidos N= 5979	Calibre vascular medido por método computadorizado	Hipertensão, diabetes e outros fatores de risco para DCV	Arteríolas de calibre menores estavam relacionadas à PAS e PAD maior, estágio de HAS, o consumo atual de álcool, índice de massa corporal e níveis mais elevados de homocisteína total. Maior calibre arteriolar retiniano foi relacionado com a diabetes, tabagismo atual, e níveis mais elevados de fibrinogênio plasmático. Maior calibre venular foi relacionada com a diabetes, tabagismo atual, maior IMC e razão quadril-cintura, níveis mais elevados de glicemia, triglicérides, LDL, PCR, fibrinogênio do plasma, IL6, sICAM-1, e PAI-1 e menores níveis de HDL-colesterol.	Wong, 2006 (89)
Cohort	Base populacional Rotterdam Eye Study, Holanda N= 5674	Calibre vascular medido por método computadorizado	Incidência de hipertensão e outros fatores de risco	Após ajuste para vários fatores de risco, estreitamento arteriolar retiniano estava associado a aumento de risco de hipertensão (RC por desvio padrão 1.38; 95% CI, 1.23 to 1.55); para estreitamento venular isto foi mesmo evidente (RC: 1.17; 95% CI, 1.04 to 1.32). Aumento de um desvio padrão da RAV aumentou risco de hipertensão em 24%.	Ikram, 2006 (22)



<b>Delineamento</b>	<b>População</b>	<b>Variáveis Retinianas</b>	<b>Variáveis Sistêmicas (ou desfecho)</b>	<b>Resumo dos achados principais</b>	<b>Referência</b>
Cohort	Base Populacional The Fungata Study Japão N= 1961 não diabéticos	Calibre vascular medido por método computadorizado e avaliação da presença ou ausência de outros sinais de retinopatia hipertensiva	Pressão Arterial	Aumento de 10mmHg na pressão arterial média associado à redução de 2,8 µm no diâmetro arteriolar.	Kawasaki, 2006 (27)
Cohort	Base populacional ARIC Study Estados Unidos N= 1849 não diabéticos	Calibre vascular medido por método computadorizado Estreitamento arteriolar generalizado, em escala continua	AVC	Estreitamento arteriolar relacionado à detecção de AVC subclínico em RNM (RC 2,3), controlado para PA e outros fatores de risco	Cooper, 2006 (11)
Transversal	Base Clínica Brasil N= 58	Razão arterio-venosa medido por método computadorizado	Pressão arterial	PAS e PA média estavam inversamente associadas à RAV. Para cada aumento de 10 mm Hg na PAS, houve uma diminuição de 0.03 unidades de RAV.	Pakter, 2005 (52)

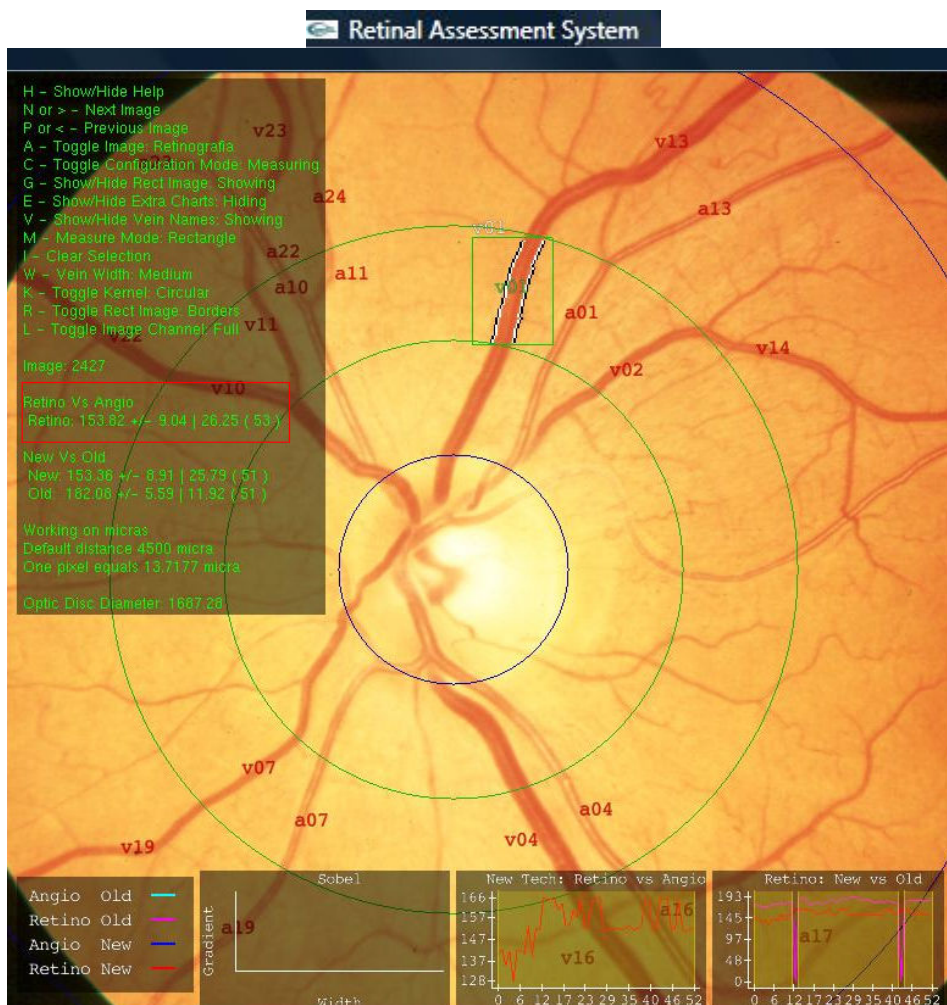
<b>Delineamento</b>	<b>População</b>	<b>Variáveis Retinianas</b>	<b>Variáveis Sistêmicas (ou desfecho)</b>	<b>Resumo dos achados principais</b>	<b>Referência</b>
Cohort	Base Populacional The Beaver Dam eye study Estados Unidos N= 2451 normotensos	Calibre vascular medido por método computadorizado	Incidência de hipertensão	Aqueles com menor RAV tiveram uma maior incidência cumulativa de HAS (incidência de 17,4%, 24,1%, 31,0% e 45,1%, respectivamente, para decrescentes quartis de distribuição da RAV. Após ajuste idade e sexo, os participantes com RAV no quartil inferior apresentaram um risco três vezes maior de HAS (razão chances 2,95, IC 95% 2,77-3,88) que aqueles no quartil superior. Concluíram que estreitamento arteriolar está associado com risco em longo prazo de hipertensão	Wong, 2004 (95)
Cohort	Base populacional BME Study, Austrália N= 3275	Calibre vascular medido por método computadorizado	Pressão arterial	Após ajuste para idade, gênero, IMC e fumo, pessoas com PA controlada (18.2%), não controlada (13.8%), ou hipertensos não tratados (13.8%) tinham probabilidade maior que normotensos (54.2%) de ter EVCR menor: RC ajustada 1.5, (95% IC, 1.1 to 1.9), 2.1 (1.6 à 2.7), e 2.1 (1.6 à 2.7), respectivamente, e menor RAV: 1.3 (1.0 à 1.6), 1.4 (1.1 à 1.8), e 1.7 (1.3 à 2.2), respectivamente.	Wang, 2003 (87)
Cohort	Base populacional Aric Study, Estados Unidos N= 9300	Método computadorizado em retinografias digitalizadas Estreitamento arteriolar generalizado, em escala continua	Pressão arterial e outros fatores de risco cardiovascular	Estreitamento arteriolar generalizado relacionado com placa carotídea, fumo, obesidade, e níveis de TG e HDL. (68) Estreitamento arteriolar generalizado relacionado à pressão atual e passada (medida 3 e 6 anos precedentes)	Sharrett, 1999 (68) (32)

<b>Delineamento</b>	<b>População</b>	<b>Variáveis Retinianas</b>	<b>Variáveis Sistêmicas (ou desfecho)</b>	<b>Resumo dos achados principais</b>	<b>Referência</b>
Transversal	Base Clínica N = 70 não diabéticos, não hipertensos Estados Unidos	Gradação oftalmoscópica do estreitamento arteriolar (classificado como normal, leve e moderado)	Doença isquêmica do coração definida por angiografia	Anormalidade no reflexo arteriolar mais sensível para indicar presença e extensão de doença coronariana. Tortuosidade e diminuição no calibre vascular menos sensível mas mais específico para lesão coronariana mais extensa.	Michelson 1979 (41)
Cohort	Base populacional Gotenburgo, Suécia N = 855 homens	Oftalmoscopia para gradação de estreitamento generalizado Estreitamento arteriolar classificado como presente ou ausente	Mortalidade cardiovascular e outros fatores de risco cardiovascular	Estreitamento generalizado associado a fumo e colesterol e a mortalidade cardiovascular em 12 anos	Svardsudd 1978(76)
Caso Controle	Base Populacional Japão N = 115 casos de AVC N= 230 controles	Gradação oftalmoscópica Estreitamento classificado como ausente ou presente	AVC	Estreitamento generalizado relacionado com AVC hemorrágico, controlado para PA e outros fatores de risco	Aoki 1975(4)

Em estudo anterior para avaliar calibre vascular retinianno, foi desenvolvido um software para avaliação de retinografias digitalizadas. (52) Através de nova versão desse software foi possível medir semi-automáticamente e de maneira reprodutível os calibres vasculares retinianos.

O software Retinal Analyser System (RAS) está apresentado na Figura 1.

**Figura 1:** Medidas dos vasos retinianos pelo software RAS: círculo central sobre o nervo óptico, de medida equivalente a 1.800 micra. O segundo, terceiro e quarto círculos à meio, 1 e 2 diâmetros de nervo óptico a partir da borda do disco, delimitam as áreas de interesse. Arteriolas (a), e vênulas (v) marcados 1-12 na zona interna (entre segundo e terceiro círculos), e 13-24 na zona externa (entre terceiro e quarto círculos). O observador define a região retangular de interesse (em verde), e o software calcula os limites do vaso, neste caso o calibre da vênula 01 é igual a  $153,82 \pm 9.04\mu\text{m}$  (dentro do retângulo vermelho).



Para aumentar a precisão dos valores absolutos dos calibres dos vasos, esses métodos precisam de um fator de escala, ou fator de calibração. O fator de escala é a relação de micra por pixel correspondente a um determinado comprimento de uma imagem digitalizada, no caso uma retinografia. Para obter a medida de calibre em micra, baseou-se em diâmetro médio do nervo óptico de 1800 $\mu$ m(23) e a distância do centro do nervo óptico até ao centro da mácula de 2,5 diâmetros de disco(77) ou 4500 $\mu$ m. Assim o fator de escala é calculado através da seguinte fórmula: Fator de escala = 4500 $\mu$ m / número de pixels. O resultado é em micra por pixels ( $\mu$ /px).

Como essas imagens variam de acordo com o equipamento óptico, ângulo da foto, e com a própria resolução da imagem, cada equipamento deve ter seu próprio fator de escala para a população investigada. Esse fator deve ser introduzido como um cálculo constante no software antes das medições do calibre dos vasos retinianos. Na falta do fator de escala, não é possível obter medidas absolutas dos diâmetros vasculares, nem compará-las a outros estudos.

A nova versão do Retinal Analyser System inclui um fator de calibração apropriado, que será descrito no primeiro artigo dessa Tese.

Observa-se, na Tabela 1, que a maioria dos estudos populacionais avaliou os calibres vasculares retinianos em retinografias coloridas. Apesar da reprodutibilidade desses métodos terem sido descritas, não encontramos estudo na literatura que demonstrasse o que realmente medem esses métodos microdensitométricos. Assim para avaliar qual o segmento vascular que estava sendo medido, ou seja, se o diâmetro vascular medido incluía a medida da parede do vaso ou era somente o lúmen vascular, foram comparadas medidas obtidas através do RAS em retinografias coloridas com medidas realizadas em angiografias fluoresceínicas, obtidas no mesmo momento. Como nas angiografias fluoresceínicas o contraste fotografado e medido representa somente o lúmen vascular, utilizamos esse método como padrão ouro ou teste de referência. O segundo artigo dessa tese apresenta as semelhanças encontradas entre as duas medidas. Os resultados sugerem que o método microdensitométrico mede o lúmen do vaso. Assim, variações de diâmetros encontradas em condições clínicas podem ser relacionadas à espessura da parede ou a vasoconstrição.

## **2.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL**

### **2.2.1 MEDIDA CASUAL DA PRESSÃO ARTERIAL**

Desde que Riva-Rocci, em 1886, criou o esfigmomanômetro(65), as medidas de pressão casuais têm sido utilizadas para a avaliação da pressão arterial, determinando o diagnóstico, estabelecendo prognóstico e avaliando a eficácia do tratamento anti-

hipertensivo instituído.

A medida casual da pressão arterial tem sido o método mais utilizado para estabelecer o diagnóstico e avaliar o efeito da terapêutica anti-hipertensiva. No entanto, nas últimas quatro décadas, tem sido discutido o valor dessas medidas para fins prognósticos. Além disso, a pressão arterial pode apresentar valores anormalmente elevados quando aferida pelo médico (síndrome do avental branco), assim como pode apresentar valores normais frente à anormalidade (hipertensão mascarada). Essas duas condições dependem de avaliação adicional por um segundo método, medida residencial da pressão arterial ou monitorização ambulatorial da pressão arterial.(2;33;43;47)

Assim, em função da variação contínua da pressão arterial, de momento a momento, de acordo com as atividades do indivíduo, novos métodos podem complementar a avaliação através de medidas repetidas da pressão arterial, permitindo a detecção da pressão arterial usual.

#### 2.2.2 MONITORIZAÇÃO AMBULATORIAL DA PRESSÃO ARTERIAL

A Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA) permite que seja realizado um grande número de medidas em 24 horas possibilitando a detecção de variações da pressão arterial na vigília e no sono. O uso da MAPA, como exame complementar, foi descrita pela primeira vez há mais de 40 anos e nos últimos dez anos está sendo mais utilizada na prática clínica de acordo com medicina baseada em evidências e vem sendo referendada há alguns anos em diretrizes como o *VII Joint National Committee*(33) nos Estados Unidos pelas IV Diretrizes Brasileiras para o Tratamento da Hipertensão Arterial.(2)

A MAPA se baseia na medida indireta e intermitente da pressão arterial. As medidas indiretas podem ser obtidas pelos métodos auscultatório e oscilométrico. O método auscultatório baseia-se na detecção do primeiro e do último ruído de Korotkoff, enquanto o método oscilométrico determina, através da identificação do ponto de oscilação máxima, a pressão arterial média e as pressões sistólicas e diastólicas, por meio de algoritmo específico.(39) Atualmente, o método oscilométrico é o mais utilizado.

A grande virtude do método é permitir a avaliação da pressão arterial durante 24 horas com os indivíduos exercendo suas atividades habituais. As principais informações clinicamente relevantes obtidas pela MAPA são: estimativa da pressão arterial média verdadeira, curva da pressão arterial, descenso noturno e variabilidade,

permitindo avaliar a resposta terapêutica de medicamentos anti-hipertensivos.(46;56;59)

Thijs et al.(79) analisaram a validade do exame baseado no número mínimo de medidas necessárias em 24 horas e concluíram que esse número mínimo deveria ser de, pelo menos, uma medida a cada 30 minutos. Considerando-se uma perda média de 20%, recomenda-se a realização das medidas, no mínimo, a cada 20 minutos durante a vigília e a cada 30 minutos no período de sono. O protocolo da MAPA, recomendado pelas diretrizes atuais, estabelece a validade da MAPA com a realização pelo menos 16 medidas válidas no período de vigília e oito durante o sono.(3)

A importância clínica da variabilidade pressórica nas 24 horas tem chamado atenção de muitos clínicos e pesquisadores na área de hipertensão arterial, pois, envolve considerações clínicas importantes como, o efeito do avental branco, a hipertensão do avental branco, o descenso noturno da pressão arterial, a elevação súbita dos níveis pressóricos nas primeiras horas da manhã e mais recentemente a identificação da hipertensão mascarada.(57;67;84)

Atualmente as indicações do uso de MAPA são:

1. Hipertensão de consultório ou hipertensão do avental branco.
2. Avaliação da hipertensão arterial resistente: quando o valor da pressão arterial permanece consistentemente elevado apesar do uso de três ou mais anti-hipertensivos com diferentes mecanismos de ação.
3. Hipertensão arterial episódica: medidas de pressão arterial de consultório normais ou elevadas, com história de medidas casuais maiores detectadas em momentos episódicos, que podem ou não estar acompanhadas de sintomas.
4. Suspeita de episódios de hipotensão arterial sintomática.
5. Avaliação da eficácia terapêutica anti-hipertensiva.

Como limitações para o uso da MAPA temos:

1. Arritmias cardíacas.
2. Hipercinesia
3. Braços que não permitam o perfeito ajuste do manguito
4. Hiato auscultatório.

Para a população de indivíduos normotensos e hipertensos, independentemente do sexo ou da idade, a MAPA é um exame que apresenta boa reprodutibilidade. Os valores da pressão arterial sistólica, diastólica e média, bem como a frequência cardíaca obtida em 24 horas, vigília e sono, apresentam resultados semelhantes em exames

consecutivos realizados em curto intervalo de tempo.(8;51)

A variação da pressão arterial entre os períodos de sono e vigília também apresenta boa reprodutibilidade quando considerada como variável contínua.(42) Entretanto, a variação da pressão arterial entre os períodos de vigília e sono tem sido considerada em duas categorias distintas. Quando ocorre queda da pressão arterial igual ou superior a 10% em relação à pressão de vigília, define-se o indivíduo como com queda da pressão arterial durante o sono ou, em inglês, como *dipper*. Quando a queda é inferior a 10%, é caracterizado como sem queda da pressão arterial durante o sono ou, em inglês, como *non-dipper*. A reprodutibilidade do caráter *dipper* e *non-dipper* tem sido questionada na literatura devido à chance de 30% a 50% dos indivíduos mudarem de categoria em exames subseqüentes. Essa aparente controvérsia se deve às limitações advindas da utilização de pontos de cortes arbitrários, nesta condição 10%, para representar variáveis contínuas. Assim sendo, o fenômeno da variação da pressão arterial entre a vigília e o sono deve ser considerado em seu valor absoluto (em mmHg) e percentual. (63)

As tabela 2 e 3 expressam os valores considerados normais, intermediários e anormais para a MAPA.(1)

**Tabela 2:** Valores normais de médias de pressão arterial para os períodos de 24 horas, vigília e sono.

Média da pressão arterial anormal (mmHg)	Sistólica	Diastólica
24 horas	>130	>80
Vigília	>135	>85
Sono	>120	>70

**Tabela 3:** Classificação da variação da pressão arterial vigília-sono

Descenso da pressão arterial durante o sono (%) para pressão sistólica e diastólica	
Presente	$\geq 10$
Ausente	$\leq 0$
Atenuado	$> 0$ e $< 10$

Os níveis da pressão arterial medidos em consultório podem ser maiores, semelhantes ou menores do que os obtidos pela MAPA durante a vigília. Essas diferenças eventuais possibilitam a classificação dos pacientes em duas diferentes



categorias: hipertensão do avental branco ou normotensão do avental branco.(58)

Há evidências de que a hipertensão do avental branco possa não ser tão benigna como inicialmente sugerido, ocorrendo maior possibilidade de acometimento de lesões em órgãos-alvo do que em populações normotensas, porém em menor escala do que em indivíduos hipertensos.(58) Por outro lado, alguns autores demonstram possibilidade semelhante de eventos cardiovasculares para esse grupo de indivíduos quando comparados com uma população de normotensos.(7) Não há características clínicas específicas que auxiliem nesse diagnóstico, embora sua prevalência aumente com a idade, notadamente no sexo feminino. Não existem evidências de benefícios de intervenções medicamentosas nesse grupo de pacientes; entretanto, o paciente deve ser considerado no contexto de seu risco cardiovascular global, permanecendo em seguimento clínico.

### 2.2.3 PAPEL DA MAPA NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA EM PACIENTES HIPERTENSOS

Por serem mais reprodutíveis e melhor estimar a variável pressão arterial, os valores de pressão arterial obtidos pela MAPA se correlacionam mais fortemente com lesões em órgãos-alvo e morbidade e mortalidade do que as medidas casuais da pressão arterial. Os valores médios de pressão arterial sistólica e diastólica de 24 horas, de vigília e de sono apresentam correlação positiva com índice de massa de ventrículo esquerdo, lesões isquêmicas encefálicas e microalbuminúria.(1)

Há maior correlação entre lesão em órgãos-alvo e os valores de pressão arterial obtidos pela MAPA do que aqueles decorrentes das medidas casuais.(54;55;83)

Okubo e cols.(50) estabeleceram correlação entre níveis de pressão arterial pela MAPA e mortalidade. Definiram valores médios de pressão arterial sistólica de 128 (120-133) mmHg e 74 (65-78) mmHg para a diastólica, a partir dos quais havia evidente e crescente aumento de mortalidade. Apesar dessa investigação ser particularizada a uma população idosa de japoneses e, portanto, com características peculiares, demonstrou-se o poder de correlação entre níveis de pressão arterial, pela MAPA, e prognóstico através desse estudo muito bem delineado e com tempo de seguimento apropriado.

Outro grande estudo (Dublin Study) acompanhou prospectivamente 5292 pacientes hipertensos não tratados (mediana de seguimento de 8,4 anos) com o objetivo de determinar se a medida da pressão arterial no ambulatório poderia prever mortalidade total e cardiovascular além da medida da pressão arterial clínica e outros fatores de risco cardiovascular.(13) O risco relativo ajustado foi 1,12 (IC 95% 1,06 a 1,18; P <0,001) para cada 10-mmHg de aumento na pressão arterial sistólica diurna e

1,21 (IC 95% 1,15 a 1,27; P <0,001) para cada 10-mmHg de aumento na pressão arterial sistólica noturna. Os autores concluíram que a medição ambulatorial da pressão arterial é superior à medição clínica em prever mortalidade cardiovascular e a que a pressão arterial noturna foi o melhor preditor do desfecho.

O estudo de maior relevância para demonstrar o papel da MAPA na avaliação do controle terapêutico de pacientes hipertensos foi o chamado estudo OvA (Office versus Ambulatory Pressure Study).(9) Este estudo foi realizado com 1963 pacientes sob tratamento e acompanhados em média por cinco anos. Diferentemente dos demais estudos realizados para determinar o papel da MAPA como fator discriminante e que agregasse valor prognóstico na análise da terapêutica anti-hipertensiva, esse foi o primeiro estudo prospectivo que usou a MAPA *versus* a medida casual no controle terapêutico de pacientes hipertensos usando medicação por pelo menos três meses e com acompanhamento de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais. Esse estudo demonstrou claramente a superioridade da MAPA sobre as medidas casuais da pressão arterial para prever eventos cardiovasculares. O risco relativo ajustado de eventos cardiovasculares associados com um incremento de 1 desvio padrão (DP) na pressão arterial sistólica da MAPA foi 1,34 (IC 95% 1,11 a 1,62) para pressão 24horas, 1,30 (IC 95% 1,08 a 1,58) para pressão da vigília, e 1,27 (IC 95% 1,07 a 1,57) para a pressão do sono. Para um incremento de 1 DP na pressão arterial diastólica da MAPA o risco relativo ajustado de eventos cardiovasculares foi 1,21 (IC 95% 1,01-1,46), 1,24 (IC 95% 1,03-1,49) e 1,18 (IC 95% 0,98 a 1,40), respectivamente.

Schrader e cols. (66) demonstraram, em ensaio clínico randomizado, envolvendo 851 pacientes, que a morbidade e mortalidade foram menores naqueles indivíduos que utilizaram os valores de pressão obtidos pela MAPA para orientar o tratamento anti-hipertensivo. Nesse estudo, foram alocados 1298 pacientes dos quais 851 concluíram o seguimento de 5 anos, sendo que 439 tiveram as medidas de consultório como referência para o seguimento e 412 as obtidas pela MAPA. No grupo da MAPA foram registrados em 5 anos de seguimento, 20 eventos primários (morbidade e mortalidade totais e eventos cerebrovasculares) contra 35 no grupo de medidas de consultório (P = 0,037). Foram identificados 22% de hipertensos do avental branco, excluídos do tratamento anti-hipertensivo medicamentoso.

Também existem estudos mostrando melhor predição de dano renal e cérebro-vascular pela MAPA do que por medidas de consultório.(49)

Assim, acumulam-se evidências, de que as pressões obtidas pela MAPA oferecem uma consistente correlação com prognóstico e, se comparadas com as

medidas casuais, de longe são mais fortes preditores de risco total, cardíaco e cerebrovascular.

O terceiro artigo desta tese avalia a associação entre calibre vascular retiniano e os parâmetros da pressão arterial obtidos por monitoramento ambulatorial da pressão arterial.

#### 2.2.4 PARÂMETROS DA MAPA

##### 2.2.4.1 Médias de pressão arterial

Dentre os parâmetros obtidos pela MAPA, as médias de pressão arterial são os melhores dados a serem analisados, por apresentarem maiores índices de correlação com diagnóstico, lesão em órgãos-alvo e prognóstico cardiovascular, tendo sido o único parâmetro relacionado à mortalidade, de acordo com o estudo de Ohkubo et al.<sup>28</sup>. A análise das médias dos períodos de 24 horas, vigília e sono são consideradas essenciais para avaliação da MAPA. Tanto as médias sistólicas quanto diastólicas, isoladas ou simultaneamente, têm valor clínico.<sup>(29)</sup>

##### 2.2.4.2 Diferenças de pressão vigília-sono

Usualmente encontra-se queda da pressão sistólica e diastólica durante o sono quando comparado ao período de vigília. Foi observado em hipertensos que queda inferior a 10% relacionava-se a pior prognóstico cardiovascular<sup>(29)</sup>. Em indivíduos normotensos, a ausência de queda da pressão arterial durante o sono não tem significado clínico confirmado.<sup>(48)</sup>

No *Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Study*, 808 pacientes idosos avaliados, em período de seguimento médio de 4,4 anos, os valores de pressão obtidos, particularmente a média de pressão sistólica durante o sono, foram significantes preditores de eventos totais, cardíacos e cerebrovasculares. Neste estudo a variável que apresentou melhor correlação com eventos cardiovasculares maiores, como acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio e óbito foi a pressão arterial sistólica do sono, seguida da pressão arterial sistólica de 24 horas e da pressão arterial sistólica de vigília.<sup>(71)</sup>

O estudo de Ohasama<sup>(29)</sup> encontrou resultados semelhantes. A intensidade da queda da pressão arterial no sono mostra correlação inversa com a massa de ventrículo esquerdo e microalbuminúria. Em relação a lesões isquêmicas encefálicas, os indivíduos com atenuação da queda durante o sono (< 10%) ou com queda noturna exagerada (> 20%) apresentam maior número de áreas isquêmicas à ressonância nuclear magnética cerebral.

O padrão *non-dipping* é mais comum em indivíduos da raça negra e tem causas múltiplas, como um alto nível de atividade durante o dia, sono de má qualidade, sistema nervoso simpático altamente ativo, o uso de glicocorticóides, e a presença de doença renal.(61) *Non-dipping* tem sido uma razão proposta para explicar maior risco de doença cardiovasculares em indivíduos da raça negra do que em pessoas de outras raças ou etnias. Existe maior probabilidade de lesões em órgãos-alvo nas populações hipertensas que não apresentam, no mínimo, 10 % de queda entre os períodos de vigília e sono. Assim, maior Índice de massa do ventrículo esquerdo(85) e maior probabilidade de lesões encefálicas(70) foram correlacionadas com ausência de descenso entre os dois períodos em questão.

#### 2.2.4.3 Frequência cardíaca

Apesar de registrarem a frequência cardíaca, os equipamentos utilizados para a MAPA não são apropriados para a obtenção desse parâmetro, não devendo, portanto, ser considerado, exceto nos equipamentos capazes de registrar simultaneamente o eletrocardiograma em 24 horas.

### **2.3 ANÁLISE DA RITMICIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL**

A monitorização ambulatorial da pressão arterial tornou possível monitorar a pressão dia e noite, e assim avaliar o ritmo da pressão arterial. Indivíduos normotensos tem um ritmo diurno da pressão arterial pronunciado. A pressão arterial cai a seu nível mais baixo durante as primeiras horas de sono, e há um aumento acentuado da PA nas primeiras horas da manhã, coincidindo com a transição entre o sono e a vigília. A diferença média entre a pressão sistólica e diastólica ao acordar e ao dormir é de 10 a 20 por cento. Pacientes com hipertensão normalmente têm o mesmo padrão, mas o perfil diurno da pressão arterial é definida em um nível mais elevado.(60)

Tem sido sugerido que o padrão circadiano da pressão arterial e também a pressão arterial noturna possa estar mais correlacionado com dano em órgão alvo que a pressão arterial em repouso e a aferida no consultório. Há evidência que uma diferença grosseira entre a pressão arterial dia/noite, o descenso noturno ou *dip*, tem um impacto adverso no prognóstico de várias populações doentes. *Non-dipping* foi sugerido como um fator prognóstico negativo em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva grave(24), insuficiência renal(80), apnéia obstrutiva do sono(75) e AVC(37). Para doença cardiovascular, Verdecchia e cols.(82) relataram uma correlação inversa entre o índice de massa ventricular esquerda (IMVE) e a porcentagem de queda da pressão arterial durante a noite. Belsha cols.(5) investigaram relações entre as variações diurnas da pressão arterial e lesão em órgãos alvo em adolescentes, e

identificaram que a pressão arterial sistólica (PAS) aferida durante o sono se correlacionou mais fortemente com o IMVE.

Metanálise avaliando se a raça poderia ser um fator significativo para a diferença nos padrões circadianos da pressão arterial, mostrou que indivíduos da raça negra tem níveis de PAS e pressão arterial diastólica (PAD) mais elevados, tanto durante o dia quanto durante a noite, e que essas diferenças foram significativamente maiores durante a noite. Esse estudo também demonstrou uma diferença no padrão da pressão arterial entre indivíduos negros americanos e negros não americanos.(62)

### 2.3.1 VARIAÇÃO CIRCADIANA DA PRESSÃO ARTERIAL E CRONOBIOLOGIA

A MAPA tornou possível avaliar a evolução temporal da pressão arterial ao longo de um período de 24 horas, e assim foi possível estudar a variação circadiana da PA, através da cronobiologia.

A cronobiologia é a ciência que quantifica e estuda objetivamente os mecanismos da estrutura temporal biológica, incluindo as manifestações rítmicas dos seres vivos, os chamados ritmos biológicos.(20)

Os ciclos podem variar desde alguns ciclos por segundo até ciclos muito longos como meses ou anos. Por analogia aos termos usados na física, as frequências maiores que um ciclo por 28 horas são chamadas de ultradianas, e os ritmos com ciclo menor que 20 horas são chamadas de infradianas. (20) Os ciclos mais estudados são aqueles que apresentam ritmos em torno de 24 horas, os chamados ritmos circadianos (período médio de 24 horas, ou duração entre 20 e 28 horas).

### 2.3.2 CONCEITOS FUNDAMENTAIS DA CRONOBIOLOGIA

Uma maneira de analisar a ritmicidade da pressão arterial é através do método Cosinor, um método de análise de regressão periódica, baseada na adaptação da função do cosseno, para valores da pressão arterial com período de 24 horas. O método Cosinor possibilita a validação da significância estatística do ritmo circadiano da pressão arterial, através da verificação de que o melhor modelo de oscilação é largo o suficiente para rejeitar a hipótese nula de amplitude zero ao um nível de probabilidade de  $p < 0.05$  (nível de significância do ritmo).

O método Cosinor gera, em cada elemento (indivíduo ou população), os seguintes parâmetros de validação do ritmo circadiano:

1. MESOR: Sigla para "Midline Estimated Statistic Of Rhythm". É a média ajustada (estatisticamente) do ritmo.
2. Período: medida entre duas repetições consecutivas

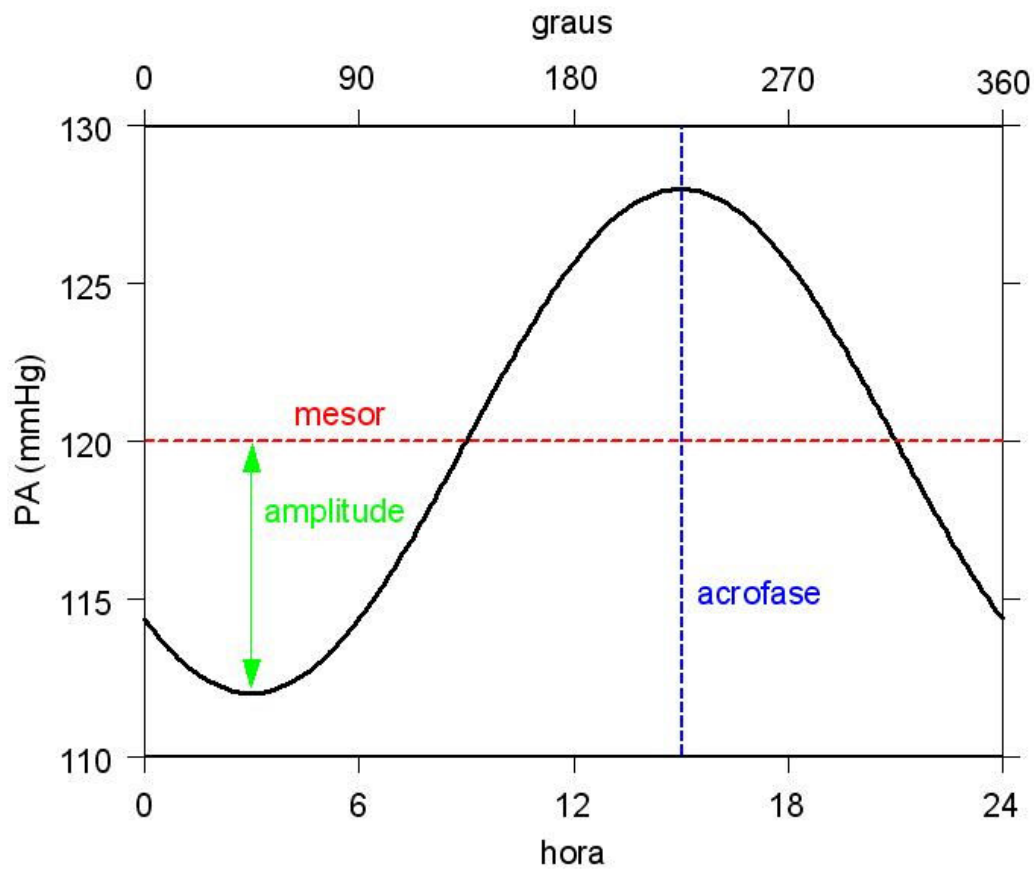
3. Acrofase: medida de localização no tempo. É uma distância, expressa em unidade de tempo ou graus radianos, de um ponto de referência ao pico da função rítmica, definida estatisticamente. Para simplificar, podemos dizer que é a medida do tempo transcorrido entre a fase de referência e a fase do valor mais elevado da pressão arterial, a partir da curva senoidal. Descreve em horas e minutos, o momento do dia no qual o ritmo circadiano mostra a sua mais alta elevação com relação à meia-noite (horário local).
4. Amplitude: medida da extensão das oscilações do MESOR. É o valor da diferença entre os valores máximo (ou mínimo) e médio (MESOR) da curva.

As Figuras 2 e 3 mostram graficamente os parâmetros obtidos através da análise de Cosinor.

A análise de Cosinor pode ser feita para avaliar o ritmo circadiano de indivíduos e também para avaliar o ritmo circadiano de populações. Nesse último caso é necessário primeiramente fazer a análise Cosinor de cada indivíduo para excluir os indivíduos que não apresentem ritmo circadiano individualmente, para posteriormente realizar a análise de Cosinor para população.

A análise de Cosinor para populações serve para analisar se o ritmo circadiano de uma variável (por exemplo pressão arterial) é diferente entre as populações em estudo. O quarto e último artigo dessa tese avalia a variação no ritmo circadiano da pressão arterial quanto ao calibre arteriolar retiniano.

**Figura 2:** Parâmetros de validação do ritmo circadiano segundo método Cosinor (cosinograma).

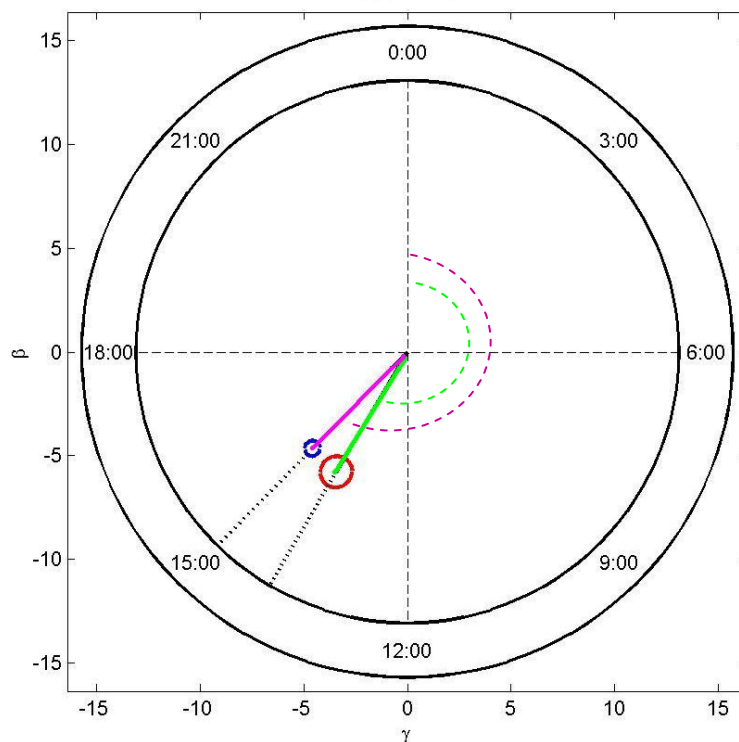


MESOR: média do ritmo ajustada estatisticamente. Neste exemplo MESOR = 120 mmHg

Acrofase: a medida do tempo transcorrido entre a fase de referência (neste exemplo 0 horas ou 0 graus) e a fase do valor mais elevado da PA (neste exemplo aproximadamente 15 horas ou 215 graus) a partir da curva senoidal.

Amplitude: diferença entre os valores máximo (ou mínimo) e o MESOR (neste caso aproximadamente: amplitude = mínimo 112 mmHg – MESOR 120 mmHg = - 8 mmHg)

**Figura 3:** Gráfico Polar para Cosinor de População: Nesta figura temos representado o cosinor de duas populações. Os raios (linhas verde e rosa) representam as amplitudes de cada população, como dois ponteiros de relógio. O ângulo destas linhas desde às zero horas representam as acrofases das populações (pontilhado verde e rosa). O intervalo de confiança 95% é representado pelo tamanho dos círculos (vermelho e azul), sendo que na direção radial temos o IC 95% da amplitude, e na direção angular o IC 95% da acrofase. Em analogia a um relógio (neste caso um relógio que marque 24 horas) os tamanhos dos ponteiros representam a amplitude de cada população e a hora a acrofase daquela população. Neste caso em particular, como não há sobreposição das elipses da direção angular, podemos dizer que as populações são diferentes estatisticamente quanto ao parâmetro acrofase.





### **3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral:**

Tendo em vista estas considerações, o objetivo do presente estudo foi avaliar, em pacientes hipertensos, a associação entre os diferentes parâmetros pressão arterial, medida através da MAPA, e os calibres vasculares retinianos medidos através de método computadorizado.

#### **Objetivos Específicos:**

1. Avaliar a associação entre pressão arterial sistólica e diastólica medida no mesmo momento da obtenção da retinografia e os calibres vasculares retinianos.
2. Avaliar a associação entre pressão arterial sistólica e diastólica 24 horas, vigília e sono e os calibres vasculares retinianos.
3. Avaliar a associação entre o ritmo circadiano da pressão arterial, através da análise de cosinor, e os calibres vasculares retinianos.

#### **Objetivos Secundários:**

Relacionados a atualização do software para aferição dos calibres vasculares retinianos.

1. Determinar um fator de calibração para incorporar ao software e testar sua reprodutibilidade intra e inter-observador.
2. Avaliar, utilizando como padrão ouro a angiografia fluoresceínica, se o software mede lúmen vascular ou calibre vascular total (lúmen e parede vascular).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Alessi A. Uso do MAPA no tratamento anti-hipertensivo. *Rev Bras Hipertens* 2006;13:203-7.
- (2) Alessi A, Brandão A A, Pierin A. IV Guideline for ambulatory blood pressure monitoring. II Guideline for home blood pressure monitoring. *IV ABPM/II HBPM Arq Bras Cardiol* 2005;85:1-18.
- (3) Alessi A, Brandão A A, Pierin A. IV Guideline for ambulatory blood pressure monitoring. II Guideline for home blood pressure monitoring. *IV ABPM/II HBPM Arq Bras Cardiol* 2005;85:1-18.
- (4) Aoki N. Epidemiological evaluation of funduscopy findings in cerebrovascular diseases. II. A multivariate analysis of funduscopy findings. *JAP CIRCULAT J* 1975;39:271-82.
- (5) Belsha CW, Wells TG, McNiece KL, Seib PM, Plummer JK, Berry PL. Influence of Diurnal Blood Pressure Variations on Target Organ Abnormalities in Adolescents With Mild Essential Hypertension. *American Journal of Hypertension* 1998 Apr;11:410-7.
- (6) Bright R. Cases and observations, illustrative of renal disease accompanied with the secretion of albuminous urine. *Heart Dis Stroke* 1836;1:338-400.
- (7) Cavallini MC, Roman M J, Pickering TG, Schwartz JE, Pini R. Is white coat hypertension associated with arterial disease or left ventricular hypertrophy? *Hypertension* 1995;26:413-9.
- (8) Chaves JR HC. Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA 24H): sua reprodutibilidade e importância na construção de modelos para estimar a hipertrofia cardíaca. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina de São Paulo 2000.
- (9) Clement DL, De Buyzere ML, De Bacquer DA. Prognostic value of ambulatory blood-pressure recordings in patients with treated hypertension. *N Engl J Med* 2003;348:2407-15.
- (10) Coles WH. Hypertension and retinal vessels. *Heart Dis Stroke* 1994;3:304-8.
- (11) Cooper LS, Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Bryan RN, Hubbard LD, et al. Retinal Microvascular Abnormalities and MRI-Defined Subclinical Cerebral Infarction: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke* 2006 Jan 1;37:82-6.
- (12) Dimmitt SB, Eames SM, Gosling P, West JN, Gibson JM, Littler WA. Usefulness of ophthalmoscopy in mild to moderate hypertension. *Lancet* 1989;1:1103-6.
- (13) Dolan E, Stanton A, Thijs L. Superiority of ambulatory over clinic blood pressure measurement in predicting mortality: the Dublin outcome study. *Hypertension* 2005;46:156-61.
- (14) Duprez DA, Cohn JN. Monitoring vascular health beyond blood pressure. *Curr Hypertens Rep* 2006;8:287-91.
- (15) Ellenberger CJ. Ischemic optic neuropathy as a possible early complication of vascular hypertension. *Am J Ophthalmol* 1979;88:1045-51.

- (16) Fishber AM, Oppenheimer BS. The differentiation and significance of certain ophthalmoscopic pictures in hypertensive disease. *Arch Intern Med* 1930;46:901-20.
- (17) Garner A, Ashton N. Pathogenesis of hypertensive retinopathy: a review. *J R Soc Med* 1979;72:362-5.
- (18) Garner A, Ashton N, Tripathi R, Kohner EM, Bulpitt CJ, Dollery CT. Pathogenesis of hypertensive retinopathy: An experimental study in the monkey. *Br J Ophthalmol* 1975;59:3-44.
- (19) Gunn M. On ophthalmoscopic evidence of general arterial disease. *Soc U K* 1898;18:356-81.
- (20) Halberg F. Chronobiology. *Annual Review of Physiology* 1969;31:675-726.
- (21) Helmholtz H. Beschreibung eines Augen-Spiegels: zur Untersuchung der Netzhaut im lebenden Auge. Berlin:A Förstner'sche 1851.
- (22) Ikram MK, Witteman JCM, Vingerling JR, Breteler MMB, Hofman A, de Jong PTVM. Retinal Vessel Diameters and Risk of Hypertension: The Rotterdam Study. *Hypertension* 2006 Feb 1;47:189-94.
- (23) Jonas JB, Gusek GC, Naumann GO. Optic disc, cup and neuroretinal rim size, configuration and correlations in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1151-8.
- (24) Kastrup J, Wroblewski H, Sindrup J, Sindrup J, Wiinberg N. Diurnal blood pressure profile in patients with severe congestive heart failure: dippers and non-dippers. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53:577-83.
- (25) Kaushik S, Wang JJ, Wong TY, Flood V, Barclay A, Brand-Miller J, et al. Glycemic Index, Retinal Vascular Caliber, and Stroke Mortality. *Stroke* 2009 Jan 1;40:206-12.
- (26) Kawasaki R, Cheung N, Wang JJ, Klein R, Klein BE, Cotch MF, et al. Retinal vessel diameters and risk of hypertension: the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of Hypertension* 2009;27:2386-93.
- (27) Kawasaki R, Wang JJ, Rochtchina E, Taylor B, Wong TY, Tominaga M, et al. Cardiovascular Risk Factors and Retinal Microvascular Signs in an Adult Japanese Population: The Funagata Study. *Ophthalmology* 2006 Aug;113:1378-84.
- (28) Keith NM, Wagener HP, Barker NW. Some different types of essential hypertension: their course and prognosis. *Am J Med Sci* 1939;197:332-43.
- (29) Kikuya M, Ohkubo T, Asavama K. Ambulatory blood pressure and 10-year risk of cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Ohasama study. *Hypertens* 2005;45:240-5.
- (30) Klein R, Klein BE, Moss SE, Wang Q. Blood pressure, hypertension and retinopathy in a population. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1993;91:207-22.
- (31) Klein R, Klein BE, Moss SE, Wang Q. Hypertension and retinopathy, arteriolar narrowing, and arteriovenous nicking in a population. *Arch Ophthalmol* 1994;112:92-8.

- (32) Klein R, Sharrett AR, Klein BEK, Chambless LE, Cooper LS, Hubbard LD, et al. Are Retinal Arteriolar Abnormalities Related to Atherosclerosis? : The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Jun 1;20:1644-50.
- (33) Lenfant C, Chobanian AV, Jones DW, Roccella EJ. Seventh Report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7): Resetting the Hypertension Sails. *Hypertension* 2003 Jun 1;41:1178-9.
- (34) Liebreich R. Ophthalmoskopischer Befund bei Morbus Brightii. *Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol* 1859;5:265-8.
- (35) Liew G, Sharrett AR, Kronmal R, Klein R, Wong TY, Mitchell P, et al. Measurement of Retinal Vascular Caliber: Issues and Alternatives to Using the Arteriole to Venule Ratio. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 Jan 1;48:52-7.
- (36) Liew G, Sharrett AR, Wang JJ, Klein R, Klein BEK, Mitchell P, et al. Relative Importance of Systemic Determinants of Retinal Arteriolar and Venular Caliber: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Ophthalmol* 2008 Oct 1;126:1404-10.
- (37) Lip GYH, Zarifis JM, Farooqi ISM, Page AM, Sagar GM, Beevers DGM. Ambulatory Blood Pressure Monitoring in Acute Stroke: The West Birmingham Stroke Project. *Stroke* 1997;28:31-35
- (38) Maestri MM, Fuchs SC, Ferlin E, Pakter HM, Nunes G, Moraes RS, et al. Detection of Arteriolar Narrowing in Fundoscopic Examination: Evidence of a Low Performance of Direct Ophthalmoscopy in Comparison With a Microdensitometric Method[ast]. *Am J Hypertens* 2007 May;20:501-5.
- (39) Mauck GB, Smith CR, Geddes LR. The meaning of the point of maximum oscillations in cuff pressure in the indirect measurement of blood pressure II. *J Biomech Eng* 1980;102:28-33.
- (40) McGeechan K, Liew G, Macaskill P, Irwig L, Klein R, Klein BEK, et al. Meta-analysis: Retinal Vessel Caliber and Risk for Coronary Heart Disease. *Annals of Internal Medicine* 2009 Sep 15;151:404-13.
- (41) Michelson EL, Morganroth J, Nichols CW, MacVaugh III H. Retinal arteriolar changes as an indicator of coronary artery disease. *Arch Intern Med* 1979;139:1139-41.
- (42) Mochizuki Y, Okutani M, Dongfeng Y, Ywasaki H, Takusagawa M, Kohno I, et al. Limited reproducibility of circadian variation in blood pressure dippers and non-dippers. *Am J Hypertens* 1998;11:403-9.
- (43) Myers MG, Haynes RB, Rabkin SW. Canadian hypertension society guidelines for ambulatory blood pressure monitoring. *American Journal of Hypertension* 1999 Nov;12:1149-57.
- (44) Newsom RS, Sullivan PM, Rassam SM, Jagoe R, Kohner EM. Retinal vessel measurement: comparison between observer and computer driven methods. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992;30:221-5.

- (45) Nguyen TT, Wang JJ, Sharrett AR, Islam FMA, Klein R, Klein BEK, et al. Relationship of Retinal Vascular Caliber With Diabetes and Retinopathy. *Diabetes Care* 2008 Mar;31:544-9.
- (46) O'Brien E. Ave atque vale: the centenary of clinical sphygmomanometry. *Lancet* 1996;348:1569-70.
- (47) O'Brien E, Asmar R, Beilin L, Imai Y, Mallion JM, Mancia G, et al. European Society of Hypertension recommendations for conventional, ambulatory and home blood pressure measurement. *Journal of Hypertension* 2003, 21:821–848.
- (48) O'Brien E, Sheridan J, O'Malley K. Dippers and non-dippers. *The Lancet* 1988 Aug 13;332-397.
- (49) O'Shea JC, Califf RM. 24-Hour ambulatory blood pressure monitoring. *Am Heart J* 2006 May;151:962-8.
- (50) Okubo T, Imai Y, Isujii I. Prediction of mortality blood pressure measurements: a pilot study in Ohasama. *J Hypertens* 1997;815:357-64.
- (51) Omboni S, Parati G, Palatini P, Vanasia A, Muiesan ML, Cuspidi C, et al. Reproducibility and clinical value of nocturnal hypotension: prospective evidence from the SAMPLE study. *J Hypertens* 1998;16:733-88.
- (52) Pakter HM, Ferlin E, Fuchs SC, Maestri MK, Moraes RS, Moreira LB, et al. Measuring arteriolar-to-venous ratio in retinal photography of patients with hypertension: development and application of a new semi-automated method. *Am J Hypertension* 2005;18:417-21.
- (53) Parr JC. Hypertensive generalised narrowing of retinal arteries. *Trans Ophthalmol Soc N Z* 1974;26:55-60.
- (54) Perloff D, Sokoly M, Cowam RM, Juster RP. Prognostic value of ambulatory blood pressure measurements: further analyses. *J Hypertens* 1989;7:S3-S10.
- (55) Pickering TG. Ambulatory blood pressure monitoring. *Curr Hypertens Rep* 2000;2:558-64.
- (56) Pickering TG, Coats A, Mallion JM, Mancia G, Verdecchia P. Blood Pressure Monitoring. Task ForceV: White-coat hypertension. *Blood Press Monit* 1999;4:333-41.
- (57) Pickering TG, Davidson K, Gerin W, Schwartz JE. Masked hypertension. *Hypertens* 2002;40:795-6.
- (58) Pickering TG, James GD, Boddie C, Harshfield GA, Blank S, Laragh JH. How common is white coat hypertension? *JAMA* 1988;259:225-8.
- (59) Pickering TG, Shimbo D, Haas D. Ambulatory blood-pressure monitoring. *N Engl J Med* 2006;354:2368-74.
- (60) Pickering TG, Harshfield GA, Kleinert HD, Blank S, Laragh JH. Blood Pressure During Normal Daily Activities, Sleep, and Exercise: Comparison of Values in Normal and Hypertensive Subjects. *JAMA* 1982 Feb 19;247:992-6.

- (61) Profant J, Dimsdale JE. Race and Diurnal Blood Pressure Patterns : A Review and Meta-Analysis. *Hypertension* 1999 May 1;33(5):1099-104.
- (62) Profant J, Dimsdale JE. Race and Diurnal Blood Pressure Patterns : A Review and Meta-Analysis. *Hypertension* 1999 May 1;33:1099-104.
- (63) Ramsay LE, Williams B, Johnston GD, Macgregor GA, Ponston L, Potter JF. Guidelines for management of hypertension: report of the third working party of the British Hypertension Society. *J Hum Hypertens* 1999;13:569-92.
- (64) Rassam SM, Patel V, Brinchmann-Hansen O, Engvold O, Kohner EM. Accurate vessel width measurement from fundus photographs: a new concept. *British Journal of Ophthalmology* 1994 Jan;78:24-9.
- (65) Riva-Rocci S. Um nuovo sfigmomanometro. *Gazzeta Medica di Torino* 1896;47:981-1001.
- (66) Schrader J, Lenders S, Zohner C, Herbold M, Schrandt G. Practice vs ambulatory blood pressure measurement under treatment with ramipril (PLUR Study): a randomised, prospective long-term study to evaluate the benefits of ABPM in patients on antihypertensive treatment. *Journal of Human Hypertension* 2000 Jul;14:435.
- (67) Sega R, Trocino G, Lanzarotti A. Alterations in cardiac structures in patients with isolated office ambulatory or home hypertension. Data from the PAMELA study *Circulation* 2001 2001;104:1385-92.
- (68) Sharrett AR, Hubbard LD, Cooper LS, Sorlie PD, Brothers RJ, Nieto FJ, et al. Retinal Arteriolar Diameters and Elevated Blood Pressure: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1999 Aug 1;150:263-70.
- (69) Sheie H. Evaluation of ophthalmoscopic changes of hypertension fundos and arteriolar sclerosis. *Arch Ophthalmol* 2010;49:117-38.
- (70) Shimada K, Kawamoto A, Matsubayashi K, Nishinaga M, Kimura S, Ozawa T. Diurnal blood pressure variations and silent cerebrovascular damage in elderly hypertensive patients. *J Hypertens* 1992;10:875-8.
- (71) Staessen JA, Trip L, Fagard R. Predicting cardiovascular risk using conventional versus ambulatory blood pressure in older patients with systolic hypertension. The Systolic hypertension in Europe (Syst-Eur) trial investigators. *JAMA* 1999;282:539-46.
- (72) Stokoe NL, Turner RW. Normal retinal vascular pattern: arteriovenous ratio as a measure of arterial calibre. *Br J Ophthalmol* 1966;50:21-40.
- (73) Sun C, Liew G, Wang JJ, Mitchell P, Saw SM, Aung T, et al. Retinal Vascular Caliber, Blood Pressure, and Cardiovascular Risk Factors in an Asian Population: The Singapore Malay Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008 May 1;49:1784-90.
- (74) Sun C, Wang JJ, Mackey DA, Wong TY. Retinal Vascular Caliber: Systemic, Environmental, and Genetic Associations. *Survey of Ophthalmology* 2001 Jan;54:74-95.

- (75) Suzuky M, Guilleminault C, Otsuka K, Shiomi T. Blood pressure "dipping" and "non-dipping" in obstructive sleep apnea syndrome patients. *Sleep* 1996;5:382-7.
- (76) Svardsudd K, Wedel H, Aurell E, Tibblin G. Hypertensive eye ground changes. Prevalence, relation to blood pressure and prognostic importance. The study of men born in 1913. *Acta Medica Scandinavica* 1978;204:159-67.
- (77) Synthanayothin C, Boyce JF, Cook HL, Williamson TH. Automated localisation of the optics disc, fovea and retinal blood vessels from digital colour fundus images. *Br J Ophthalmol* 1999;83:902-10.
- (78) Tanabe Y, Wang JJ, Wong TY, Mitchell P, Daimon M, Oizumi T, et al. Retinal arteriolar narrowing predicts 5-year risk of hypertension in Japanese people: the Funagata study. *Microcirculation* 2010;17:94-102.
- (79) Thijs L, Staessen J, Fagard R, Zacariah P, Amery A. Number of measurements required for the analysis of diurnal blood pressure profile. *J Hum Hypertens* 1994;8:239-44.
- (80) Timio M, Venanzi S, Lolli S, Lippi G, Verdura C, Monarca C, et al. "Non-dipper" hypertensive patients and progressive renal insufficiency: a 3-year longitudinal study. *Clin Nephrol* 1995;43:382-7.
- (81) Tso M O M, Jampol LM. Pathophysiology of hypertensive retinopathy. *Ophthalmology* 1982;89:1132-45.
- (82) Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Gattobigio R, Guerrieri M, Comparato E, et al. Altered circadian blood pressure profile and prognosis. *Blood Press Monit* 1997;2:347-52.
- (83) Verdecchia P. Prognostic: Value of ambulatory blood pressure: current evidence and clinical applications. *Hypertension* 2000;35:844-51.
- (84) Verdecchia P, Reboldi GP, Angeli F. Short and long term incidence of stroke in white-coat hypertension. *Hypertens* 2005;45:203-8.
- (85) Verdecchia P, Schillaci G, Guerrieri M, Gatteschi C, Benemio G, Boldrini F, et al. Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Circulation* 1990 Feb 1;81(2):528-36.
- (86) Walsh J. Hypertensive retinopathy: description, classification, and prognosis. *Ophthalmology* 2010;89:1127-31.
- (87) Wang JJ, Mitchell P, Leung H, Rochtchina E, Wong TY, Klein R. Hypertensive Retinal Vessel Wall Signs in a General Older Population: The Blue Mountains Eye Study. *Hypertension* 2003 Oct 1;42:534-41.
- (88) Wang JJ, Rochtchina E, Liew G, Tan AG, Wong TY, Leeder SR, et al. The Long-term Relation among Retinal Arteriolar Narrowing, Blood Pressure, and Incident Severe Hypertension. *Am J Epidemiol* 2008 Jul 1;168:80-8.
- (89) Wong TY, Islam FMA, Klein R, Klein BEK, Cotch MF, Castro C, et al. Retinal Vascular Caliber, Cardiovascular Risk Factors, and Inflammation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 Jun 1;47(6):2341-50.

- (90) Wong TY, Kamineni A, Klein R, Sharrett AR, Klein BE, Siscovick DS, et al. Quantitative Retinal Venular Caliber and Risk of Cardiovascular Disease in Older Persons: The Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med* 2006 Nov 27;166:2388-94.
- (91) Wong TY, Klein R, Klein BEK. Retinal microvascular abnormalities and their relations with hypertension, cardiovascular diseases and mortality. *Surv Ophthalmol* 2001;46:59-80.
- (92) Wong TY, Klein R, Nieto FJ, Klein BEK, Sharrett AR, Meuer SM, et al. Retinal microvascular abnormalities and 10-year cardiovascular mortality: A population-based case-control study. *Ophthalmology* 2003;110:933-40.
- (93) Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Schmidt MI, Pankow JS, Couper DJ, et al. Retinal Arteriolar Narrowing and Risk of Diabetes Mellitus in Middle-aged Persons. *JAMA* 2002 May 15;287:2528-33.
- (94) Wong TY, McIntosh R. Hypertensive retinopathy signs as risk indicators of cardiovascular morbidity and mortality. *Br Med Bull* 2005 Sep 7;73-74:57-70.
- (95) Wong TY, Shankar A, Klein R, Klein BEK, Hubbard LD. Prospective cohort study of retinal vessel diameters and risk of hypertension. *BMJ* 2004 Jul 10;329:79.
- (96) Yu T, Mitchell P, Berry G, Li W, et al. Retinopathy in older persons without diabetes and its relationship to hypertension. *Arch Ophthalmol* 1998;116:83-9.



## 5 ARTIGO 1

### COMPUTER-ASSISTED METHOD TO EVALUATE RETINAL VASCULAR CALIBER: REPRODUCIBILITY OF SCALE FACTOR ASSESSMENT

Journal: Acta Ophthalmologica – Submetido

Authors: Helena Messinger Pakter

Sandra C Fuchs

Marcelo K Maestri

Elton L Ferlin

Aline Marcadenti

Estefânia Wittke

Flávia F Ghizzoni

Lucas V Fraga

Flávio D Fuchs

From the Postgraduate Studies Program in Epidemiology (HMP, SCF) and Cardiology (LBM, FDF), Informatics Institute (CPR), Divisions of Cardiology (FDF) and Ophthalmology (MKM), Hospital de Clinicas de Porto Alegre, and the National Institute for Science and Technology for Health Technology Assessment (IATS/CNPq), Porto Alegre, RS, Brazil.

Address for correspondence:

Prof. Dr. Sandra C. Fuchs

Instituto de Avaliação de Tecnologias em Saúde (IATS)

Centro de Pesquisa Experimental, 2º andar, CARDIOLAB

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ramiro Barcellos, 2350, 2º andar

90.035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone/FAX: + 5551-33597621/3359-8420

E-mail: [scfuchs@terra.com.br](mailto:scfuchs@terra.com.br)

## Resumo:

**Objetivo:** Avaliar a reprodutibilidade intra-observador e inter-observador do fator de escala de um método computadorizado para avaliação do calibre vascular da retina. **Métodos:** Trinta e um voluntários realizaram retinografias, sob midríase, em ângulo de 30 graus, enquadrando o disco óptico e a mácula no mesmo campo. As fotos foram digitalizadas em 600 dpi e 1200 dpi. O fator de escala foi calculado pela média da distância em pixels do centro do disco até o centro da mácula, estimando-se que anatômicamente esta distância é de 4.500 micra. Dois oftalmologistas e dois não-oftalmologistas, independentemente, mediram duas vezes cada foto. **Resultados:** Os voluntários tinham idades entre 20-73 anos (média de  $46,9 \pm 15,1$ ) e 35.5% eram do sexo masculino. O fator de escala médio em 600dpi foi OD  $13.36 \pm 0.76\mu/\text{px}$  e OE  $13.72 \pm 0.93\mu/\text{px}$ . Em 1200 dpi, o fator de escala médio foi de OD  $6.71 \pm 0.41\mu/\text{px}$  e OE  $6.87 \pm 0.45\mu/\text{px}$ . O coeficiente de correlação intra-classe (ICC) e 95% de intervalo de confiança (IC) para o oftalmologista A foi 600dpi: 0.98 (0.96-0.99); 1200dpi: 0.97 (0.95-0.98) e para o oftalmologista B, 600dpi 0.97 (0.95-0.98); 1200dpi: 0.97 (0.95-0.98). O ICC inter-observador foi: 600dpi: 0.93 (0.88-0.96); 1200dpi: 0.96 (0.92-0.97). A concordância entre oftalmologista e não oftalmologista também foi excelente, com diferenças médias de aproximadamente  $\pm 0.1 \mu\text{m}$ , sendo o pior CCI 0.92 e o melhor CCI 0.99. **Conclusões:** Fator de escala desenvolvidos especificamente para cada retinógrafo e software de medida vascular retiniana podem ser feitas por não oftalmologistas treinados com boa reprodutibilidade e alta concordância entre observadores.

## Abstract

**Purpose:** To present a scale factor of a computer-assisted method for retinal vascular caliber assessment and to assess intra-observer and inter-observer reproducibility of its measurement.

**Methods:** A 30-degree angle film-based retinal photograph, under pharmacological pupil dilation, was taken for each eye of thirty-one volunteers, focusing the optic disc and the macula in the same field. The slides were digitized in 600dpi and 1200 dpi. The scale factor was calculated as the mean distance in pixels from the center of the disc to the center of the macula, assumed to be 4500 micrometers. Ophthalmologists and non-ophthalmologists, masked for each other, measured twice each photo.

**Results:** Volunteers had 20 to 73 years of age ( $46.9 \pm 15.1$  years) and 35.5% were males. The mean scale factor in 600dpi was OD  $13.36 \pm 0.76\mu/\text{px}$  and OS  $13.72 \pm 0.93\mu/\text{px}$ . In 1200 dpi, mean scale factor was OD  $6.71 \pm 0.41\mu/\text{px}$  and OS  $6.87 \pm 0.45\mu/\text{px}$ . The intra-class correlation coefficient (ICC) and 95% confidence intervals (CI) for ophthalmologist A was: 600dpi: 0.98 (0.96-0.99); 1200dpi: 0.97 (0.95-0.98). ophthalmologist B, 600dpi 0.97 (0.95-0.98); 1200dpi: 0.97(0.95-0.98). The inter-observer ICC (95%CI) was: 600dpi: 0.93 (0.88-0.96); 1200dpi: 0.96 (0.92-0.97). The agreement between non-ophthalmologist and ophthalmologist observers was also excellent, with values of mean differences around  $\pm 0.1 \mu\text{m}$ , being the worst ICC 0.92 and the best ICC 0.99.

**Conclusions:** Scale factors developed for specific fundus cameras and retinal vessel measurement software can be measured by trained non-ophthalmologists observers with good reproducibility and high agreement between different observers.

**Key Words:** hypertension, retinal vessel, retinal caliber, scale factor, computer-assisted image analysis, reproducibility, intra-observer, inter-observer.

## **Introduction**

Retinal microvascular abnormalities, mainly arteriolar narrowing, have been associated to the incidence (Wong et al. 2004, Smith et al. 2004) and severity of hypertension (Smith et al. 2004), heart failure (Wong et al. 2005), coronary artery disease (Wong et al. 2002), stroke (Wong et al. 2001), and cardiovascular mortality (Wong et al. 2003). These observations emerged mainly from computer-assisted methods of digitized fundus photograph, which improved the evaluation of the caliber of retinal vessels. Many of these methods are classified as microdensitometric since they are based on differences of pixel densities between the retina background and the vessel interior (Pakter et al. 2005, Wong et al. 2003, Wong et al. 2001, Rassam et al. 1994). They provide an estimate of the vessel edge (Wong et al. 2001), which are largely independent of the observer (Pakter et al. 2005) and are more precise than alternative methods to detect the caliber of arterioles and venules (Wong 2005).

Nonetheless, measurements of vessel calibers need a scale factor to correct absolute values for the magnification of eye-camera optic effect, scanner resolution and refractive errors (Lee et al. 2000, Patton N et al. 2006). Although images captured directly from digital cameras and from digitized film images might introduce systematic differences, the retinal vessel diameters seems to be comparable and it is likely that inferences about factors associated with retinal vessel diameters will not be biased by the method of imaging (Mosher A et al. 2006). The scale factor is the ratio of micrometers per pixel in a definite length of a digitized imaging of the eye fundus. As these images depend on optic equipments, image resolution and image angle, each retinal vessel measurement study using the same fundus camera (analogic or digital) and the same scanner (if analogical camera is used) should have its own scale factor. This scale factor should be introduced as a constant in the software, previously to the measurement of the vascular calibers. Without a correction by the scale factor, it is not possible to measure the width of vessels, but just to describe the arteriole-to-venous ratio.

The development and utilization of automated digital diagnostic systems of eye fundus photograph for research and telemedicine (Patton, 2006) require the existence of such scale factor. The aim of this study was to describe a method to determine the scale factor, to assess intra-observer and inter-observer reproducibility of its measurement and differences between eyes.

## **Material and Methods**

This cross-sectional study enrolled participants undergoing clinical evaluation and healthy volunteers in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. In the total, we recruited 31 individuals (11 males and 20 females) that agreed to participate, signed an informed consent and had fundus photography taken of one or two eyes. The study was approved by the Ethics Committee of our Institution, which is accredited by the Office of Human Research Protections as an Institutional Review Board, and follows the Tenets of the Declaration of Helsinki.

### **Images acquisition**

Thirty-degree angle retinal photographs were obtained using a Zeiss FF450<sup>plus</sup> Fundus Camera (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany), and Fujichrome Velvia 100 (Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan), focusing optic disc and macula in the same field. Pictures were taken under pupil dilation, 20 minutes after instillation of tropicamide eye drops. The color slides were digitized in a 35-mm film scanner Hewlett Packard model Photo Smart 20S (Hewlett Packard, Andover, MA) with resolutions of 600 and 1200 dots per inch. These resolutions were adopted as technical requirements of the microdensitometric software version. Images were stored in 24 bits (true color).

### **Image Measurement**

The measurements were done by two groups of independent observers: two ophthalmologists and two non-ophthalmologists (a cardiologist and a nutritionist). The non-specialists were trained by one ophthalmologist to identify macula and optic disc in a sample of fundus pictures. The distance in pixels from center of optic disc to center of macula was measured using a caliber tool of our microdensitometric software (Pakter et al. 2005). After opening the image at the workstation monitor, the observer clicked the mouse at the center of the optic disc and dragged it to the center of the macula (Figure 1). Each image was measured twice, not successively, at the same workstation.

### **Determination of the Scale Factor**

The scale factor was determined by measuring the distance between the center of macula to center of optic disc in a sample of digitized photographs containing the macula and the optic disc in the same field. By assuming that the average disc diameter is 1800 $\mu$ m (Jonas et al. 1988) and the distance from center of optic disc to the center of the macula is 2.5 disc

diameters (Synthanayothin et al. 1999) or 4500 $\mu\text{m}$ , the scale factor was calculated by the following formula:

Scale factor = 4500 $\mu\text{m}$  / number of pixels from center of macula to center of optic disc.

The unit of the scale factor is therefore micrometers per pixels ( $\mu\text{m}/\text{px}$ ).

## **Statistical Analysis**

In order to know by how much the measurement made by observed A is likely to differ from the measurement made by observed B, we estimated the bias by the mean difference ( $d$ ) and the standard deviation of the differences ( $s$ ). It is expected that most of the differences would lie between  $d - 2s$  and  $d + 2s$ . Provided differences within  $d \pm 2s$  would not be statistically important, we could use two observers and two image resolutions interchangeably. We will refer to these as the "limits of agreement" (Bland and Altman, 1986). We also calculate intra class correlation coefficients (ICC). Mean differences of the scale factor between right and left eyes were compared by a paired t-test or independent samples t-test.

## **Results**

Thirty-one volunteers, aged 20 to 73 years ( $46.9 \pm 15.1$ ), were enrolled in this study, and a third were males. Table 1 shows bias and limits of agreement for intra- and inter-observer agreement of the two ophthalmologist, as well as intra-class correlation coefficients (ICC). The agreement between non-ophthalmologist and ophthalmologist observers was also excellent, with values of mean differences around  $\pm 0.1 \mu\text{m}$ , being the worst ICC 0.92 and the best ICC 0.99.

Table 1 shows scale factor as determined by the two ophthalmologists (observer 1 and 2), its bias, limits of agreement, and intra-class correlation coefficient (ICC) with 95% confidence intervals (CI) for intra and inter-observer reliability.

There was statistically significant difference of the scale factor between the right and the left eye of the same subject ( $P = 0.01$ , paired sample t-test), but there were no marked differences between the right and the left eyes within the sample ( $P = 0.12$ , independent sample t-test). In 600 dpi resolution images, mean scale factor of right eye (OD) was 13.36

$\pm 0.76 \mu\text{m}/\text{px}$  and for left eye (OS) was  $13.72 \pm 0.93 \mu\text{m}/\text{px}$ . In 1200 dpi resolution images, mean scale factor of OD was  $6.71 \pm 0.41 \mu\text{m}/\text{px}$  and OS was  $6.87 \pm 0.45 \mu\text{m}/\text{px}$ .

Figure 1 shows the Bland and Altman plots for intra-observer differences. The regression line of difference versus average and its 95% confidence interval was  $y = 0.02 + 0.0009 x$ ;  $p=0.98$ .

Figure 2 shows the Bland and Altman plot for inter-observer differences in the 1200 dpi resolution images. The regression line of difference versus average and its 95% confidence interval was  $y = 0.17 + -0.026 x$ ;  $p=0.69$ .

Figure 3 shows a thirty-degree retinal photography focusing optic disc and macula in the same field with the scale factor in micrometers per pixel units.

## **Discussion**

This study showed very good agreement among trained observers, ophthalmologists and non-ophthalmologists, in the measurement of the scale factor. High intra-class coefficients showed scale factors for the same eyes measured by different observers were very similar. Although differences between right and left eyes among the same subjects might have resulted in different scale factors, these differences are not clinically relevant. They are likely to represent the biological variation among distances between optic disc and the macula, expected in double organs as the eyes. For this reason, we calculated the mean scale factor, using measurements of both observers and both eyes. In the overall sample, small differences between eyes were not statistically significant, and give support for the use of a single eye vessel measurement in larger studies.

The 600 dpi and 1200 dpi resolutions used in our digitized fundus pictures are below the image resolutions usually utilized in studies that analyze retinal vessel measurements. They represent the worst scenario to perform the analysis with the microdensitometric system, but no significant differences were observed concerning the agreement from 600 dpi or 1200 dpi. Therefore, this technical requirement did not bias the measurement of the scale factor, and we could expect similar results from fundus images with greater resolutions.

When measuring retinal vessel width from digitized images, apart from the sharpness of the image, several factors influence accuracy of the measurements. These factors include

distance of the eye to camera, movement of the subject, respiration and point in the pulse cycle (Mosher et al. 2006), and refraction (George et al. 1990, Wu et al. 1995, Arnold et al. 1993). In order to minimize the systematic errors listed above, an alternative is to determine a scale factor that will account for these magnification artifacts. This is done in a sample of images, acquired by the same camera system as the study images, prior to data analysis, assuming anatomic measurements reported in literature (Jonas et al. 1988, Elledge et al. 2005), considering that exact precision is impossible (Mosher 2006). Another possibility would be a scale (like a micro-rule) incorporated to the fundus camera optic system that would serve as tool to adjust the image size according to the magnification differences. To our knowledge, this is the first report regarding scale factor assessment for fundus photograph and the reproducibility of its measurement. The excellent agreement ( $ICC \geq 0.90$ ) reassured the reproducibility of the method (Streiner DL, 1989).

In conclusion, the development of a scale factor for each fundus cameras used in retinal vessel measurement softwares is necessary to precisely measure the width of vessels. Trained non-ophthalmologists observers are able to determine the scale factor with precision and reproducibility.

### **Acknowledgements**

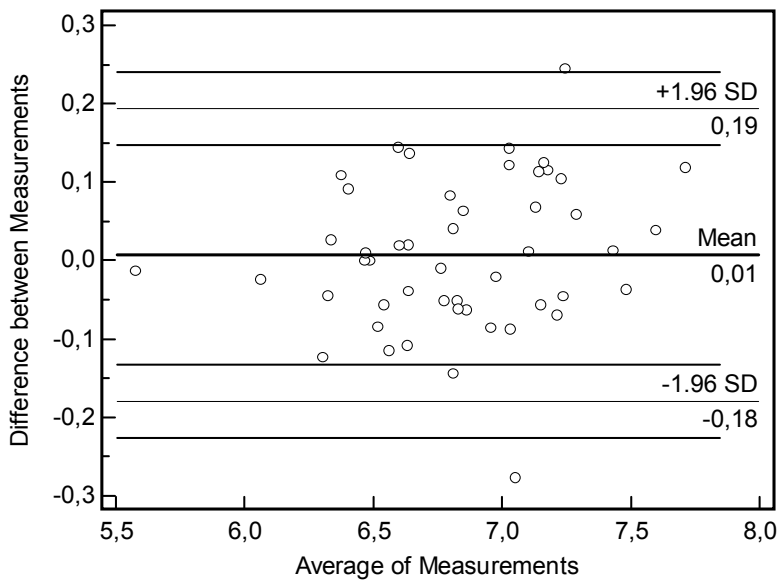
This study was funded, in part, by National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), National Institute for Science and Technology for Health Technology Assessment (IATS/Brazil) – CNPq/Brazil, and Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. Helena M Pakter thanks *Hospital Nossa Senhora da Conceição*, RS, Brazil for the free time from work in order to take part in this study.



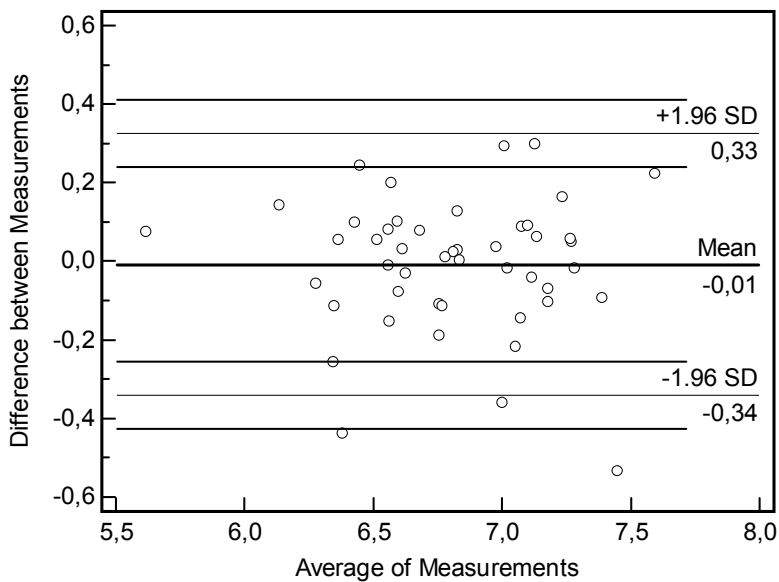
**Table 1.** Scale factor, intra-class correlation coefficient with 95% CI, bias and limits of agreement for intra and inter-observer reliability

	<b>Image Resolution (dpi)</b>			
	<b>600</b>		<b>1200</b>	
<b>Intra-observer reliability</b>	<b>Observer 1</b>	<b>Observer 2</b>	<b>Observer 1</b>	<b>Observer 2</b>
Scale Factor (mean $\pm$ SD) $\mu$ /px	13,61 $\pm$ 0,8	13,67 $\pm$ 0,8	6,83 $\pm$ 0,4	6,8 $\pm$ 0,4
ICC (95% CI)	0,98 (0,96 to 0,99)	0,97 (0,95 to 0,98)	0,97 (0,95 to 0,98)	0,97 (0,95 to 0,98)
Bias (95% CI)	-0,004 (-0,05 to 0,05)	0,009 (-0,04 to 0,06)	-0,007 (-0,02 to 0,03)	0,01 (-0,03 to 0,06)
Limits of agreement	-0,35 to 0,35	-0,33 to 0,34	-0,18 to 0,19	-0,29 to 0,32
<b>Inter-observer reliability</b>	<b>600</b>		<b>1200</b>	
Scale Factor (mean $\pm$ SD) $\mu$ /px	13,65 $\pm$ 0,8		6,84 $\pm$ 0,4	
ICC (95% CI)	0,93 (0,88 to 0,96)		0,96 (0,92 to 0,97)	
Bias (95% CI)	0,06 (-0,02 to 0,15)		0,008 (-0,01 to 0,05)	
Limits of agreement	-0,53 to 0,65		-0,34 to 0,24	

**Figure 1:** Bland and Altman plot. The differences between repeated measurements done by same observer (intra-observer) are plotted against the averages of the measurements.



**Figure2:** Bland and Altman plot. The differences between repeated measurements done by two observers (inter-observer) are plotted against the averages of the measurements made in 1200 dpi image resolutions.



**Figure 3:** Retinography showing the software in the scale factor determination mode. The scale factor is equal to 4500  $\mu\text{m}$  divided by the distance between the optic disc center and the macular center. In this case,  $4500 \mu\text{m} / 281.836 \text{ pixels} = 15.97$  (image resolution = 600 dpi).



## References

1. Arnold JV, Gates JW, Taylor KM (1993). Possible error in the measurement of retinal lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2576-2580.
2. Bland JB, Altman DG (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* i: 307-310.
3. Elledge JA, Davis MD, Hubbard LD, Reimers JL, Fink CA, Hafford DG, Susman RA (2005). Diameter/area of standardized optic disc and accurate scaling in retinal images. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: e-abstract 2583.
4. George GS, Wolbarsht ML, Landers MB III (1990). Reproducible estimation of retinal vessel width by computerized microdensitometry. *Int Ophthalmol* 14: 89-95.
5. Hubbard LD, Brothers RJ, King WN, Clegg LX, Klein R, Cooper LS, et al. (1999). Methods for evaluation of retinal microvascular abnormalities associated with hypertension/sclerosis in the atherosclerosis risk in communities study. *Ophthalmology* 106: 2269-2280.
6. Jonas JB, Gusek GC, Guggenmoos-Holzmann I, Naumann GOH (1988). Variability of the real dimensions of normal human optic discs. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 226: 332-336.
7. Mosher A, Klein BEK, Klein R, Knudtsom MD, Ferrier NJ (2006). Comparison of retinal vessel measurements in digital vs film images. *Am J Ophthalmol* 142: 875-878
8. Pakter HM, Ferlin E, Fuchs SC, Maestri MK, Moraes RS, Nunes G, Moreira LB, Gus M, Fuchs FD (2005). Measuring arteriolar-to-venous ratio in retinal photography of patients with hypertension: development and application of a new semi-automated method. *Am J Hypertens* 18: 417-421.
9. Patton N, Aslam TM, MacGillivray T, Deary IJ, Dhillon B, Eikelbomm RH, Yogesan K, Constable IJ (2006). Retinal image analysis: concepts, applications and potential. *Progress in Retinal and Eye Research* 25: 99-127.
10. Rassam SM, Patel V, Brinchmann-Hasen O, et al. (1994). Accurate vessel width measurement from fundus photographs: new concept. *Br J Ophthalmol* 78: 24-29.
11. Smith W, Wang JJ, Wong TY, Rochtchina E, Klein R, Leeder SR, Mitchell P (2004). Retinal arteriolar narrowing is associated with 5-year incident severe hypertension: the Blue Mountains Eye Study. *Hypertens* 44: 442-447.
12. Streiner DL, Norman GR. *Health measurement scales: A practical guide to their development and use*. Oxford: Oxford University Press; 1989.

13. Synthanayothin C, Boyce JF, Cook HL, Williamson TH (1999). Automated localisation of the optic disc, fovea and retinal blood vessels from digital color fundus image. *Br J Ophthalmol* 83: 902-910.
14. Wong TY, Klein R, Couper DJ, Cooper LS, Shahar E, Hubbard LD, Wofford M, Sharret AR (2001). Retinal microvascular abnormalities and incident strokes. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet* 358: 1134–1140.
15. Wong TY, Klein R, Klein BE, Tielsch JM, Hubbard LD Nieto FJ (2001). Retinal microvascular abnormalities and their relationship with hypertension, cardiovascular disease, and mortality. *Surv Ophthalmol* 46: 59-80.
16. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Duncan BB, Couper DJ, Tielsch JM, Klein BE, Hubbard LD (2002). Retinal arteriolar narrowing and risk of coronary heart disease in men and women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA* 287: 1153-1159.
17. Wong TY, Klein R, Nieto FJ, Klein BE, Sharrett AR, Meuer SM, Hubbard LD, Tielsch JM (2003). Retinal microvascular abnormalities and 10-year cardiovascular mortality: a population-based case-control study. *Ophthalmol* 110: 933-940.
18. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Duncan BB, Couper DJ, Klein BE, Hubbard LD, Nieto FJ (2004). Atherosclerosis Risk in Communities Study. Retinal arteriolar diameter and risk for hypertension. *Ann Intern Med* 140: 248-255.
19. Wong TY, Shankar A, Klein R, Klein BE, Hubbard LD (2004). Prospective cohort study of retinal vessel diameters and risk of hypertension. *BMJ* 329: 79.
20. Wong TY, Knudson MD, Klein R, Klein BEK, Meuer SM, Hubbard LD (2004). Computer-assisted measurement of retinal vessel diameters in the Beaver Dam Eye Study- methodology, correlation between eyes and effect of refractive errors. *Ophthalmology* 111: 1183-1190.
21. Wong TY, Rosamond W, Chang PP, Couper DJ, Sharrett AR, Hubbard LD, Folsom AR, Klein R (2005). Retinopathy and risk of congestive heart failure. *JAMA* 293: 63-69.
22. Wong TY (2005). Retinal arteriolar narrowing and hypertension. *Am J Hypertens* 18: 297-298.
23. Wu DC, Shwartz B, Schwoerer J, Banwatt R (1995). Retinal blood vessel width measured on color fundus photographs by image analysis. *Acta Ophthalmol* 215(suppl): 33-40.

## 6 ARTIGO 2

### **COMPUTER-ASSISTED METHODS TO EVALUATE RETINAL VASCULAR CALIBER: WHAT ARE THEY MEASURING?**

Journal: Investigative Ophthalmology and Vision Science – Em revisão

Authors: Helena Messinger Pakter

Sandra C. Fuchs

Marcelo K. Maestri

Leila B. Moreira

Luciana dei Riccardi

Vitor Pamplona

Manuel Oliveira

Flávio D. Fuchs

Prêmio Menção Honrosa recebido na 17º Jornada Gaúcha de Oftalmologia 26 de Junho de 2010.

## Resumo

**Introdução:** Métodos assistidos por computador para medir diâmetros dos vasos retinianos tem sido incorporados à pesquisa, no entanto não se sabe se o calibre medido corresponde ao lumen vascular somente ou inclui parede vascular. **Objetivos:** Comparar medidas do diâmetro dos vasos da retina, obtidas pelo método microdensitométrico em retinografias coloridas (RC) e angiografias fluoresceínicas (AF). **Métodos:** RC e AF foram obtidas em 52 olhos. Calibres arteriolar e venular foram avaliados em duas zonas ao redor do disco óptico (interna e externa). Coeficientes de correlação de Pearson e concordância de Bland e Altman foram utilizados para avaliar concordância entre RC e AF. **Resultados:** As diferenças entre os diâmetros (RC – AF) foram  $2,59 \pm 8,67 \mu\text{m}$  arteriolas da zona interna,  $4,93 \pm 7,47 \mu\text{m}$  arteriolas da zona externa,  $-1,58 \pm 8,49 \mu\text{m}$  venulas da zona interna, e  $-1,80 \pm 7,28 \mu\text{m}$  venulas da zona externa. Diferenças encontradas pela análise de Bland e Altman foram pequenas. Coeficientes de correlação Pearson para arteriolas foram 0,84 zona interna e 0,87 zona externa, e venulas de 0,93 e 0,94, respectivamente. **Conclusão:** As diferenças encontradas foram muito pequenas, demonstrando que o método microdensitométrico mede principalmente lumen vascular. Diferenças nos diâmetros vasculares observadas em condições clínicas podem, portanto, ser atribuídas à variação da espessura da parede ou vasoconstrição.

## Abstract

**Background:** Computer-assisted methods to measure retinal vessel diameters have been incorporated to research but it is not clear which vessel component they are measuring.

**Objectives:** To compare measurements of retinal vessels diameter by imaging processor software of color retinographies (CR) and fluorescent angiographies (FA). **Methods:** CR and FA pictures were taken simultaneously of 52 eyes from 31 patients referred to perform angiography for investigation of retinal diseases. Arteriolar and venular calibers were measured in two areas around the optic disc center (inner and outer circles) after adjustment the images for the magnification differences using a calibration factor. Pearson correlation coefficients and Bland and Altman plots were employed to evaluate the agreement between the measurements done by CR and FA. **Results:** The differences between the diameters measured by the microdensitometric method from CR and AF were  $2.59 \pm 8.67 \mu\text{m}$  in the inner arteriola,  $4.93 \pm 7.47 \mu\text{m}$  in the outer arteriola,  $-1,58 \pm 8.49 \mu\text{m}$  in the inner venula,  $-1.80 \pm 7.28 \mu\text{m}$  in the outer venula. The differences plotted by Bland and Altman method were small. The Pearson correlation coefficients of measurements done by CR and FA were 0.84 for inner zone and 0.87 for outer zone arterioles, and 0.93 and 0.94 for venules, respectively. **Conclusion:** The very small differences between measurements of retinal vessels diameter by the two methods demonstrates that the microdensitometric method is mostly measuring the vessel lumen. Differences of vessel diameters measured by the microdensitometric method observed in clinical conditions may be therefore ascribed to variation in wall thickness or vasoconstriction.

**Key Words:** Retinal vessels, diagnostic imaging, photography, fluorescein angiography, image interpretation, computer assisted.



## **Introduction**

Digital image processing of retinographies developed in recent years<sup>1, 2</sup> have improved the measurements of retinal vessels diameters and its application in the investigation of mechanisms and stratification of risk for cardiovascular diseases. Retinal arteriolar and venular diameters and their relationship have been associated with the incidence of hypertension<sup>3</sup> and severe hypertension<sup>4</sup>, heart failure<sup>5</sup>, coronary artery disease<sup>6, 7</sup>, stroke<sup>8</sup>, and cardiovascular mortality.<sup>9</sup> These observations have been consistently reported since computer-assisted methods were introduced for retinal vessel measurements, with great reproducibility<sup>1, 9</sup> in digitized fundus photographs from large cohort population studies.<sup>2, 10-12</sup>

While the computer-assisted methods, mainly the microdensitometric, have improved retinal vascular diameter assessment in color digital fundus photography, it has not yet been determined if these methods actually measure the outer vessel diameter (vessel wall and lumen), central red blood cells column or even the overall lumen. The premises are that, as in other vessels, blood cells remain at the central part of the retinal vessels, while the outer column, with a slower stream, is essentially made of plasma. Colored fundus photographs seem to show the blood column of the retinal vessels, while the slower peripheral plasma stream and the vessel walls would be transparent to direct visualization.<sup>13</sup>

The fluorescent angiography is the technique of choice to visualize the entire blood column, since the fluorescein dye binds to plasma proteins, and therefore measuring the entire lumen and excluding the vessel wall. The comparison between vascular caliber measured by imaging processor software in color retinographies (CR) and fluorescent angiographies (FA) has not been properly assessed. The comparison of simultaneous measurements of retinal vessel diameter by both methods would allow to estimate if the indirect method is measuring the central blood flow, the lumen or the entire vessel. Since fluorescent angiography is an invasive, laborious and potentially harmful exam, it cannot be used to assess vascular calibers in large samples, and could be replaced by indirect methods if the precise correlation between them could be established.

The aim of this study was to determine if images taking from retinographies by the microdensitometric method are measuring the central flow, or the entire lumen, or the entire retinal vessel, taking as gold standard the fluorescein angiography.

## **Methods**

### Sample

Patients referred for fluorescein angiography to an ophthalmology clinic in Porto Alegre, southern Brazil, were enrolled to participate in this cross-sectional study. Participants had indication to do fluorescein angiography for clinical conditions such as retinal diseases.

Tenets of the Declaration of Helsinki were followed and informed consent was signed. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas of Porto Alegre, which is accredited by the Office of Human Research Protections as an Institutional Review Board.

#### Image Acquisition

Fundus photographs were captured by a digital fundus camera system (Topcon TRC 50 EX and Topcon MT-10 Camera, Topcon Co. Japan, Retinal Imaging System Angioimage TM, v. 1.51, Argentina), in a 35°-degree angle. Twenty minutes after pharmacological pupil dilation with tropicamide 1% drops, color fundus photographs were obtained, including optic disc centered images. After this, 5 ml of 10% fluorescein sterile dye (Ophthalmos Farm. Ind., São Paulo, Brazil) was injected intravenously into the antecubital vein, and fluorescein angiography was performed in a usual way, concerning its clinical indication.

For this study, we have included an optic disc centered image during the fluorescein angiography procedure. The image was captured in the moment that both arterioles and venules were full of fluorescein (arterial-venous phase). The images were storage in BMP format and have an original size of 5,62 megabits each.

#### Alignment of Image Pairs Organization

The selected optic disc centered acquired images were organized in pairs (color fundus photography-fluorescein angiography) and cropped to a common resolution (1.616x1.216 pixels). For alignment, the operator marked at least three pairs of corresponding points on each image pair (i.e., at least three points on the retinography, and their counterparts on its associated angiography). Such correspondence was established at the valleys of vessel bifurcations, defining a transformation that aligned the vessels of an image pair. The transformation matrix was computed solving a system of linear equations obtained from the image coordinates of the corresponding points. With the alignment of retinography-angiography pairs, we were able to compute the average vessel caliber for any given vessel segment in both retinography and angiography at the same time.

#### Retinal Vessel Measurements

At the opening of an image pair in the software, four concentric rings were automatically dropped over it. The inner circle measured the equivalent of 1800 micra (using the calibration factor of 7.73  $\mu$ /px, described below), and it was centered at the optic disc head. The center of the optic disc was computed as the average coordinates of the set of pixels in the brightest regions (intensity bigger than 250) in the green channel of the image. The diameter of the optic disc in each image was computed as the largest continuous bright pixel segments along horizontal and vertical pixel scans. The second, third, and fourth rings have one and a half, two, and three disc diameters, respectively. If, in case, the program had aligned the rings incorrectly at the optic disc, the operator could adjust them.

Two concentric zones were delimited: the *inner zone* (A), ranging from one half of the disc diameter to one full disc diameter; and the *outer zone* (B), between one and two disc diameters from the margin (Figure 1). Details have been previously described.<sup>1</sup>

In order to measure the vessel caliber, the updated version of the software comprises four steps: (i) Definition of a region of interest (ROI); (ii) Calculation of vessels' boundaries; (iii) Determination of vessel orientation; and (iv) Vessel diameter measurement (Figure 2).

Once the user had provided a rectangular region of interest, the software computed the vessel boundaries using the green channel of the retinographies. The vessels' boundaries were found using the wide-line detector model of Liu et al.<sup>14</sup> This model reduces the width of the smooth transitions (blur) between the background color and the vessel color, and then sets the vessel edge as the spatial middle point in this transition space. The reduction of smooth regions allowed greater reliability and reproducibility of the results. Noise and defocus frequently found in low quality retinographies did not significantly affect the measurements. Our implementation uses the bright and dark line configurations for angiograph and retinograph images, respectively. As parameters for Liu et al.'s detector model, the radius of the circular mask is set to 25% of the optical disc radius, and the brightness contrast threshold is set to be the standard deviation of the luminance values in the region of interest. After the detection of the vessels, the software applied a noise removal filter using mathematical morphology to remove thin lines and some artifacts generated by high-frequency retinal background textures.

Since vessels are not straight lines, the measurements must take into account the changes in vessel orientations along the images. Therefore, the software extracted the medial axis for each vessel. The medial axis was the set of pixels inside the vessel that are equidistant to the vessel borders. It can be seen as the skeleton of the vessel. Each axial pixel was the source of a measurement, which was performed perpendicularly to the orientation of the medial axis at that point. Thus, the number of measurements made in a region of interest is directly proportional to the image resolution.

#### Determination of the Scale Factor

In order to increase precision of the absolute values of vessel caliber measurements, we used a calibration factor to adjust for the magnification differences due to camera optics, image resolution or patient refractive errors. The calibration factor is the ratio of micra per pixel in a definite length of a digitized image of the eye fundus. It was introduced as a calculation constant in the microdensitometric software before the measurements of the vascular calibers were done.

The calibration factor was determined measuring the distance between the center of macula to center of optic disc in a sample of 20 color photographs containing the macula and the optic disc in the same field, using a customized caliper tool of our software.

By assuming that the average disc diameter is  $1800\ \mu\text{m}^{15}$  and the distance from center of optic disc to the center of the macula is 2.5 disc diameters<sup>16</sup> or  $4500\ \mu\text{m}$ , the scale factor was calculated by the following formula:

$$\text{Scale factor} = 4500\mu\text{m} / \text{number of pixels from center of macula to center of optic disc}$$

For these study, the obtained calibration factor was 7.73 micra per pixels ( $\mu\text{m} / \text{px}$ ).

### **Reliability of the method**

Reproducibility of the methods were tested by an ophthalmologist that assessed the same photos twice and an independent ophthalmologist that verified a sub sample of 20% of the photos, in order to determine intra-observer and inter-observer reliability, respectively. Reliability of the method was determined using intra-class correlation coefficient (ICC).

### **Statistical analysis**

The caliber of the vessels was defined by the mean value of each vessel segment measured at the color retinography and its paired fluorescent angiography. We excluded from the analysis vessel segments that had only measurements from one type of image. These limitations were due to artifacts or blurriness of one of the images. Pearson correlation coefficients and Bland and Altman plots were employed to evaluate the agreement between the measurements done by CR and FA. In the Bland and Altman approach, the differences between the two techniques (CR and FA) are plotted against the averages of the two techniques. Horizontal lines are drawn at the mean difference, and at the limits of agreement, which are defined as the mean difference plus and minus 1.96 times the standard deviation of the differences.<sup>17</sup>

### **Results**

A total of 46 patients (83 eyes) were examined, 16 volunteers (31 eyes) were excluded and 30 participants with 52 eyes were analyzed. The main exclusion criteria were media opacities, diabetic retinopathy grade 2 or worst, vein/arteries occlusions, or technical limitations previously described. Table 1

Mean arteriolar and venular calibers in inner and outer zones, in micra, as measured in color retinographies and fluorescent angiographies are shown in Table 2. The inner zone mean arteriolar caliber of  $94.34 \pm 15.1\ \mu\text{m}$  and mean venular caliber of  $110.2 \pm 18.7\ \mu\text{m}$  observed in the color retinographies were virtually the same as those of the measurements of the fluorescent angiographies (mean arteriolar lumen of  $91.8 \pm 15.7\ \mu\text{m}$  and mean venular lumen of  $111.6 \pm 22.3\ \mu\text{m}$ ). The same occurs at the outer zone.

The Pearson correlation coefficients of measurements done by CR and FA were 0.84 for inner zone and 0.87 for outer zone for arterioles, and 0.93 and 0.94 for venules, respectively.

Intra and inter observer agreement showed excellent agreement with ICC ranging from 0.94 to 0.99 (Table 3).

Bland and Altman plots and regression lines between the measurements done in CR and AF for inner and outer arterioles and venules are presented in the Figures 3 to 6. The differences of measurements done by both methods were slight. Arterioles tended to have larger diameters when measured by CR and venules when measured by FA.

## **Discussion**

This study showed that retinal vessel diameters measured in color fundus photographs were quite similar to those measured in fluorescent angiography photographs. These results were observed both in arterioles and venules. To the best of our knowledge, these findings have not been previously reported concerning the use of a computer-assisted method to take retinal vessel measurements.

In paraffin sections of human retina, the major arteries have a luminal diameter around 100  $\mu\text{m}$  near the optic disc, and their wall thickness around 18  $\mu\text{m}$  at this point.<sup>18</sup> Even though our measurements were made at least 1 disc diameter from optic disc margin, where the vessels are naturally narrower than at the optic disc margin, they could be considered representative of in vivo vessel diameters. As the differences of arterioles caliber measurements between color and fluorescent angiographies images were inferior to 5 micra (less than 3  $\mu\text{m}$  for arterioles and less than 5  $\mu\text{m}$  for venules, even in larger arterioles), it is highly probable that vessel walls are not measured by CR microdensitometric methods. Recently Michelson et al. have shown a noninvasive method to estimate the wall thickness of small retinal vessels using scanning laser doppler flowmetry.<sup>19</sup> With this technique they found mean retinal temporal superior artery diameter of  $110 \pm 16.8 \mu\text{m}$  and mean retinal temporal superior vein diameter of  $134 \pm 20.1 \mu\text{m}$ . Flow diameters was  $82.3 \pm 13.4 \mu\text{m}$  for the artery, and  $97.9 \pm 18.3 \mu\text{m}$  for the vein. By this, they estimated the thickness of each side of the artery walls to be  $14.0 \pm 5.3 \mu\text{m}$ , and the thickness of each side of the vein walls to be  $18.1 \pm 7.5 \mu\text{m}$ . Although our measurements done in color retinographies in the inner area (closer to the optic disc) were very similar to the study above, they were wider regarding the lumen, which were acquired from a conventional digital fundus camera different from the former equipment.

Since the measures in FA images included the complete blood column, i.e. central red blood cells and peripheral plasmatic stream, it would be expected a wider vessel diameter in these images than in color fundus images, that was mainly composed by the central red blood

stream. But we found the opposite: the same diameter for veins in both types of images and a 2 to 3 micra wider diameter for arterioles observed in color photographs than in their fluorescent angiographies pairs. This fact points out that the retinal vessel diameters measured in color fundus photographs could be representative of the complete vessel lumen as in fluorescent angiography. This could be explained by the Poiseuilles Law, which states, "in small vessels essentially all the blood is near the vessels wall. So, the extremely rapidly flowing central stream of blood does not exist".<sup>20</sup> As retinal vessel are small vessels, the central red blood cells and the peripheral plasma stream would be closer together, filling the vessel lumen with a more homogeneous blood column.

The impossibility of measuring the retinal vessel wall in color fundus photographs could also be related to the fact that the wall is transparent to the light, whereas the blood reflects it, and therefore color images tend to miss the walls. In addition, since the vessel has a cylindrical shape, the light that shines at the edge of the vessel was partially scattered decreasing the possibility to detect the vessel wall exactly.

Although the difference from the measurements in CR and FA were minimal, it is of interest to note that they work in opposite ways. While the arterioles have larger diameters in the measurements done in the CR, the venules have larger diameters in the measurements done in the FA. Also, by analyzing the regression line shown with the Bland and Altman plots, we noticed that in the case of venules, as the average of the measurements increased, the deltas were even more negative. Among the reasons that could explain these observations, it might be related to the lower oxygen saturation in the venules, and thus blood appeared darker at the color photos, the software could more easily detect the boundary between blood column and the background, while in the arterioles the boarder was more discrete. The influence of the variation due to the cardiac cycle was a matter of concern.<sup>21-23</sup> The pulse wave difference between the two images (CR and FA) could bias the measurements. Since our software does multiple measurements along a vessel segment, potential influences of the cardiac cycle were lessened. In addition, the small size of retinal vessels (approximately 50–200 micra) could be a reason for measurements not to be completely accurate.<sup>13</sup> We worked on images bigger than 5 MB size, that have a reasonable resolution for vessel measurements, and we have excluded vessels with less than 50 micra. Other possible explanations for the mild and no significant differences we have observed could be the degree of systemic autonomic nerve stimulation<sup>24</sup> degree of fundus pigmentation.<sup>25</sup> One could consider some measuring bias of the retinopathies that indicated the fluorescent angiographies, but we emphasize that the objective was a vessel-to-vessel comparison between the fundus images pairs.

Reviewing the recent literature we found only one study that compares retinal vessel diameters in paired color and fluorescent angiography fundus photographs.<sup>26</sup> The authors acknowledge that the accuracy of their approach has not been properly validated. While their technique seems to reasonably recover the structure of the retinal vessel network, it only computes the average diameter value for any vessel segment, which should not include any branching structures. Our approach, on the other hand, computes the diameters of a vessel segment at as many cross sections as there are pixels in its skeleton (several hundred in a typical segment). As a result, we can produce more reliable statistics about the vessels' diameters and, consequently, more reliable comparisons between the pairs of vessels imaged by angiography and retinography techniques.

In conclusion, our computer-assisted method for retinal vessel analysis by a microdensitometric method of color retinography is able to precisely measure the complete blood column that fills the vessel lumen, including the central red blood cells and the peripheral plasma stream, excluding the vessel wall. Studies of correlations between vessels diameters and cardiovascular outcomes should therefore assume that microdensitometric methods of color retinographies are measuring the vessel lumen, which can be influenced by the wall thickness or vasoconstriction.

**Table 1** Characteristics of study population (n= 30 patients, 52 eyes)

---

Age, mean years $\pm$ SD	57.2 $\pm$ 8.7
Male sex, n (%)	14 (46.7%)
Race White, n (%)	29 (96.7%)
Diagnosis, n eyes (%)	
Normal	30 (57.7%)
Diabetic Retinopathy, grade 1	12 (23.1%)
Glaucoma	3 (5.8%)
Peripapilar atrophy	2 (3.8%)
Serpiginous choroidopathy	2 (3.8%)
Choroidal nevus	1 (1.9%)
Chronic Central Serous Retinopathy	1 (1.9%)
Cicatricial Toxoplasmosis Retinochoroiditis	1 (1.9%)

---



**Table 2:** Mean arteriolar and venular calibers, in micra, in inner and outer zones, as measured in color retinographies (CR) and fluorescent angiographies (FA).

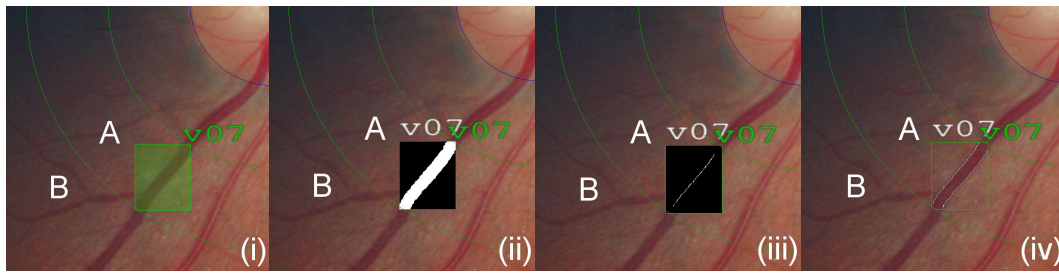
	N	Mean	SD	Range	Minimum	Maximum
<b>Inner arteriola</b>						
Color retinography	124	94.34	15.10	67.64	59.98	127.62
Fluorescent angiography	124	91.75	15.69	83.51	59.28	142.79
Delta CR-FA	124	2.59	8.67	66.78	-36.22	30.56
<b>Outer arteriola</b>						
Color retinography	127	94.04	14.71	77.19	56.79	133.98
Fluorescent angiography	127	89.11	14.70	84.94	54.58	139.52
Delta CR-FA outer	127	4.93	7.47	37.98	-14.79	23.19
<b>Inner venula</b>						
Color retinography	147	110.02	18.68	89.08	61.59	150.67
Fluorescent angiography	147	111.60	22.30	96.69	58.61	155.30
Delta CR-FA inner	147	-1.58	8.49	43.86	-20.09	23.77
<b>Outer venula</b>						
Color retinography	159	107.66	18.42	91.02	54.88	145.90
Fluorescent angiography	159	109.46	21.39	96.89	57.93	154.82
Delta CR-FA outer	159	-1.80	7.28	46.74	-20.43	26.31

N = number of vessels measured

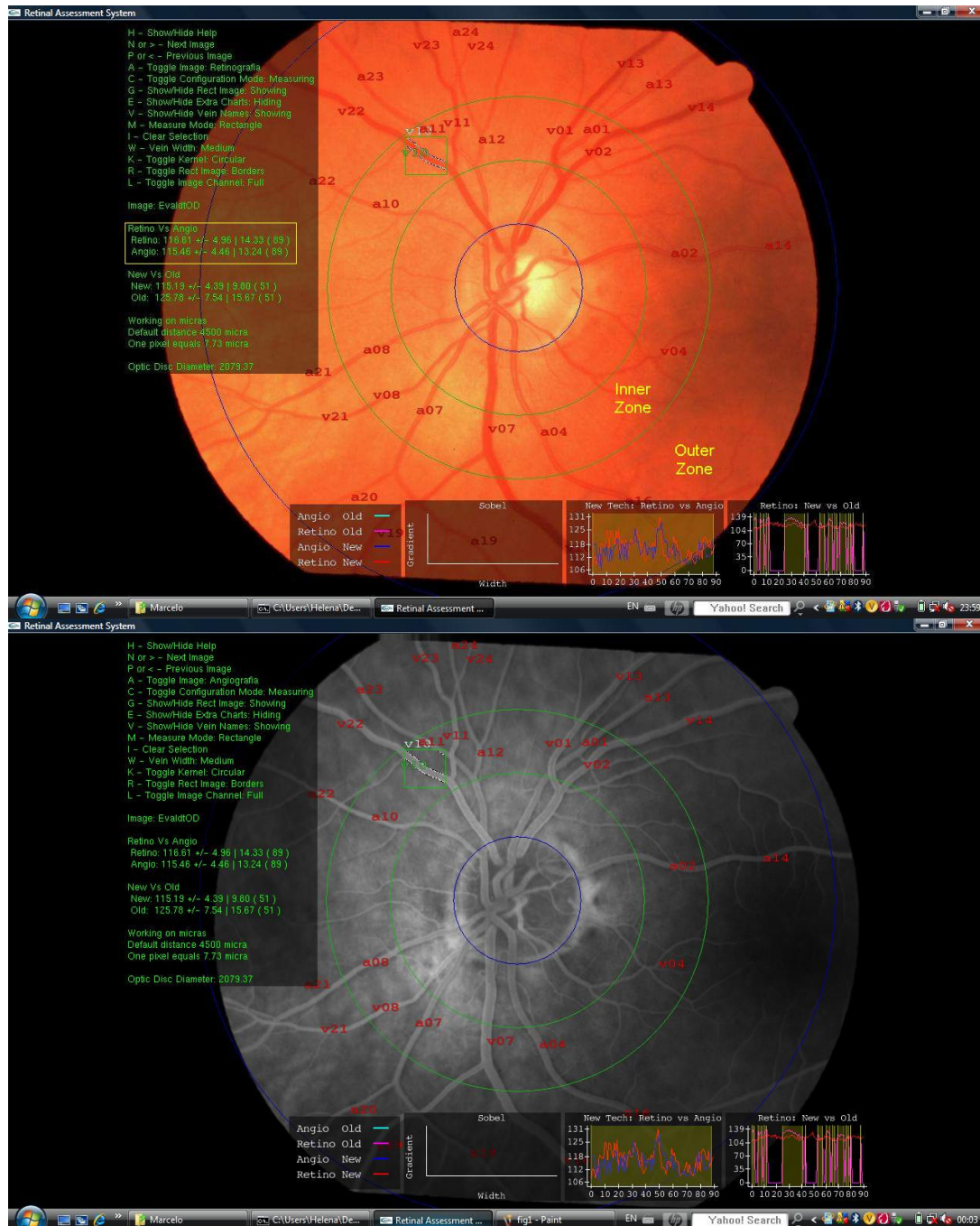
**Table 3:** Intra-class correlation coefficient (ICC) with 95% confidence intervals (CI) for intra and interobserver reliability.

	ICC (95% CI) inter observer	ICC (95% CI) intra observer
FA inner arteriola	0.975 (0.953 - 0.986)	0.978 (0.978 - 0.993)
CR inner arteriola	0.977 (0.962 - 0.986)	0.950 (0.902 - 0.975)
FA inner venula	0.988 (0.979 - 0.993)	0.998 (0.996 - 0.999)
CR inner venula	0.978 (0.962 - 0.987)	0.983 (0.968 - 0.991)
FA outer arteriola	0.957 (0.930 - 0.973)	0.974 (0.958 - 0.984)
CR outer arteriola	0.941 (0.901 - 0.964)	0.941 (0.900 - 0.964)
FA outer venula	0.986 (0.978 - 0.991)	0.991 (0.982 - 0.995)
CR outer venula	0.991 (0.986 - 0.995)	0.978 (0.947 - 0.989)

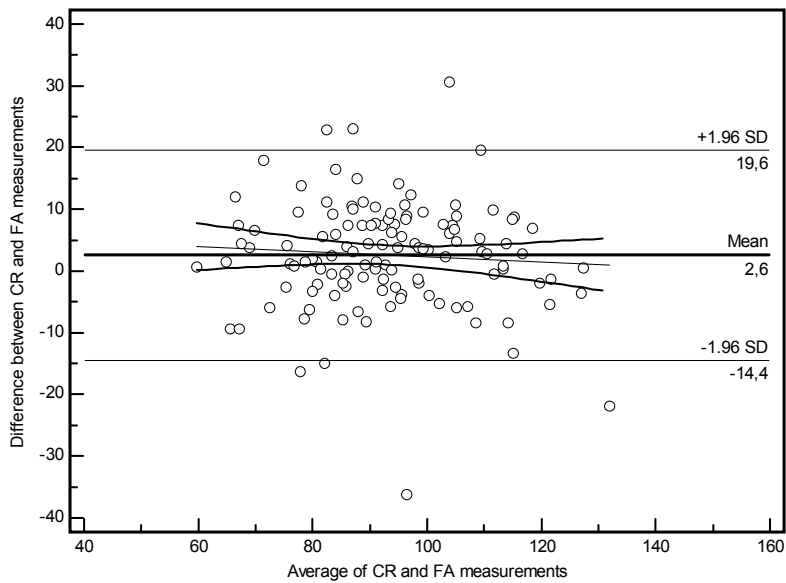
**Figure 1:** Four steps of our software: (i) User selects a region of interest; (ii) software finds the vessels; (iii) software calculates the medial axis; (iv) the final vessel border with calibers calculated at every axial point. A: Inner Zone, B: Outer Zone.



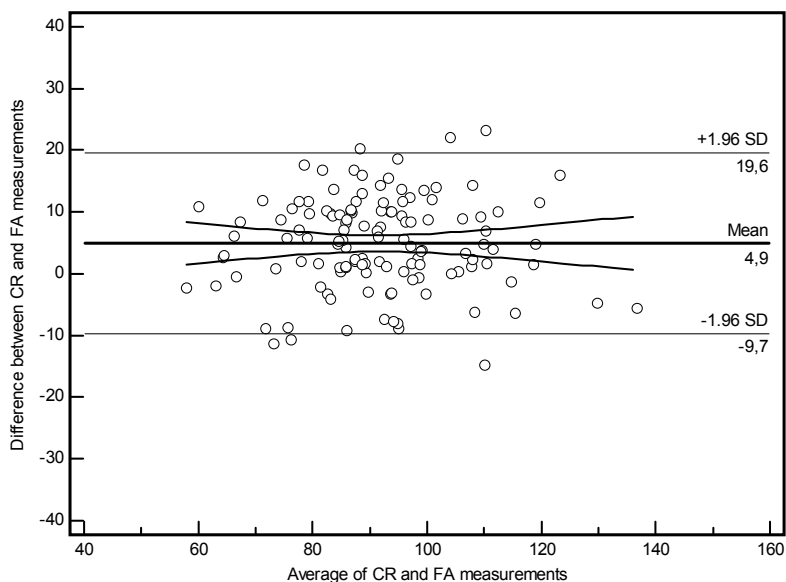
**Figure 2:** Software window showing a venula (v10) being measured in the inner zone of a color retinography (top) and at a fluorescein angiography (bottom). For each pair of CR and FA, a maximum of 24 arteriolas and 24 vein segments were identified and could be measured (12 of each in the inner zone, and 12 of each in the outer zone). The measurements results are presented at left side of image. Highlighted here, inside the yellow box, venule diameter as measured in the CR ( $116.61 \pm 4.96 \mu\text{m}$ / maximum deviation of  $14.33 \mu\text{m}$  (89 measurements done in this segment)). For each segment measure the statistics were sent to a database automatically.



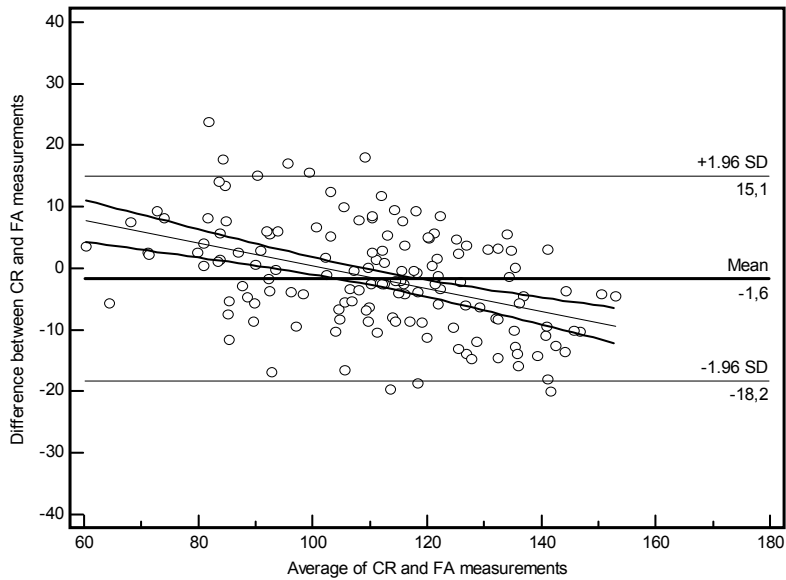
**Figure 3:** Bland and Altman plot for inner arterioles. The differences between the measurements acquired in two types of images (CR - FA) are plotted against the averages of the measurements. The regression line of difference versus average and its 95% confidence interval is also shown ( $y = 6.44 + 0.041 x$ ,  $p=0.19$ ).



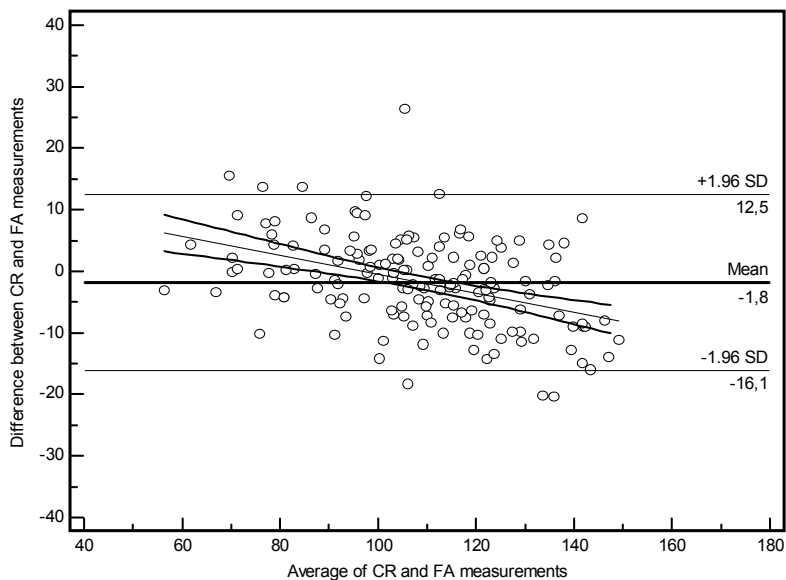
**Figure 4:** Bland and Altman plot for outer arterioles. The differences between the measurements acquired in two types of images (CR - FA) are plotted against the averages of the measurements. The regression line of difference versus average and its 95% confidence interval is also shown ( $y = 4.89 + 0.0004 x$ ,  $p=0.26$ ).



**Figure 5:** Bland and Altman plot for inner venules. The differences between the measurements acquired in two types of images (CR - FA) are plotted against the averages of the measurements. The regression line of difference versus average and its 95% confidence interval is also shown ( $y = 18.70 + -0.18 x$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figure 6:** Bland and Altman plot for outer venules. The differences between the measurements acquired in two types of images (CR - FA) are plotted against the averages of the measurements. The regression line of difference versus average and its 95% confidence interval is also shown ( $y = 14.86 + -0.15 x$ ,  $p < 0,0001$ ).



## References:

1. Pakter HM, Ferlin E, Fuchs SC, et al. Measuring arteriolar-to-venous ratio in retinal photography of patients with hypertension: development and application of a new semi-automated method. *Am J Hypertension*. 2005;18:417-421.
2. Sharrett AR, Hubbard LD, Cooper LS, et al. Retinal Arteriolar Diameters and Elevated Blood Pressure: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol*. 1999;150:263-270.
3. Wong TY, Shankar A, Klein R, Klein BEK, Hubbard LD. Prospective cohort study of retinal vessel diameters and risk of hypertension. *BMJ*. 2004;329:79.
4. Smith W, Wang JJ, Wong TY, et al. Retinal Arteriolar Narrowing Is Associated With 5-Year Incident Severe Hypertension: The Blue Mountains Eye Study. *Hypertension*. 2004;44:442-447.
5. Wong TY, Rosamond W, Chang PP, et al. Retinopathy and Risk of Congestive Heart Failure. *JAMA*. 2005;293:63-69.
6. Duncan BB, Wong TY, Tyroler HA, Davis CE, Fuchs FD. Hypertensive retinopathy and incident coronary heart disease in high risk men. *British Journal of Ophthalmology*. 2002;86:1002-1006.
7. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, et al. Retinal Arteriolar Narrowing and Risk of Coronary Heart Disease in Men and Women: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA*. 2002;287:1153-1159.
8. Wong TY, Sharrett AR, Couper DJ. Retinal microvascular abnormalities and incident strokes. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet*. 2001;358:1134-1140.
9. Wong TY, Klein R, Nieto FJ, et al. Retinal microvascular abnormalities and 10-year cardiovascular mortality: A population-based case-control study. *Ophthalmology*. 2003;110:933-940.
10. Ikram MK, Witteman JCM, Vingerling JR, Breteler MMB, Hofman A, de Jong PTVM. Retinal Vessel Diameters and Risk of Hypertension: The Rotterdam Study. *Hypertension*. 2006;47:189-194.
11. Wang JJ, Liew G, Klein R, et al. Retinal vessel diameter and cardiovascular mortality: pooled data analysis from two older populations. *European Heart Journal*. 2007;28:1984-1992.
12. Wong TY, Islam FMA, Klein R, et al. Retinal Vascular Caliber, Cardiovascular Risk Factors, and Inflammation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:2341-2350.

13. Patton N, Aslamc T, MacGillivrayd T, et al. Retinal image analysis: concepts , applications and potential. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2006;25:99-127.
14. Liu L, Zhang D, You J. Detecting Wide Lines Using Isotropic Nonlinear Filtering. *Image Processing, IEEE Transactions on*. 2007;16:1584-1595.
15. Jonas JB, Gusek GC, Naumann GO. Optic disc, cup and neuroretinal rim size, configuration and correlations in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988;29:1151-1158.
16. Synthanayothin C, Boyce JF, Cook HL, Williamson TH. Automated localisation of the optics disc, fovea and retinal blood vessels from digital colour fundus images. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:902-910.
17. Bland J M, Altman D G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1 (8476):307-310.
18. Hogan MJ, Alavarado JA, Weddel JE. Histology of the Human Eye - an atlas and textbook. In: Philadelphia: WB Saunders Company; 1971:508-521.
19. Michelson G, Warntges S, Baleanu D, et al. Morphometric age-related evaluation of small retinal vessels by scanning laser Doppler flowmetry: determination of a vessel wall index. *Retina*. 2007;27:490-498.
20. Guyton AC, Hill JE. Overview of the circulation: medical physics of pressure, flow, and resistance. In: *Textbook of Medical Physiology* Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Inc.; 2006:161-170.
21. Chen HC, Patel V, Wiek J, Rassam SM, Kohner EM. Vessel diameter changes during the cardiac cycle. *Eye*. 1994;8:97-103.
22. Dumskyj MJ, Ishii N, Nishihara Y, Horie A. The accurate assessment of changes in retinal vessel diameter using multiple frame electrocardiograph synchronised fundus photography. *Curr Eye Res*. 1996;15:625-632.
23. Knudtson MD, Klein BEK, Klein R, et al. Variation associated with measurement of retinal vessel diameters at different points in the pulse cycle. *British Journal of Ophthalmology*. 2004;88:57-61.
24. Baer R, Hill D. Retinal vessel responses to passive tilting. *Eye*. 1990:751-756.
25. Hubbard LD, Ehrhardt B, Klein R. The association between generalized arteriolar narrowing and blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33 (Suppl.):804.
26. Martinez -Perez, Hughes AD, Thom SA, Bharath AA, Parker KH. Segmentation of blood vessels from red-free and fluorescein retinal images. *Medical Image Analysis*. 2007;11:46-61.



## 7 ARTIGO 3

### **ARE RETINAL VESSELS CALIBERS INFLUENCED BY BLOOD PRESSURE MEASURED SIMULTANEOUSLY AND AT THE SAME DAY BY AMBULATORY BLOOD PRESSURE MONITORING?**

Journal: Investigative Ophthalmology and Vision Science - Ainda não submetido

Authors: Helena Messinger Pakter

Sandra C. Fuchs

Em nome dos pesquisadores do Estudo Monitor

## **Resumo:**

**Objetivo:** Verificar se a relação entre pressão arterial e calibre arteriolar e venular da retina é influenciada pela medida da pressão arterial no momento da obtenção da retinografia.

**Métodos:** Calibre arteriolar na retina, calibre arteriolar venular e razão arterio-venosa (RAV) foram medidos a partir de fotografias digitalizadas da retina pelo método microdensitométrico em 448 pacientes com hipertensão. Todos os participantes foram submetidos a 24 horas de monitoramento da pressão arterial ambulatorial (MAPA) no mesmo dia da retinografia.

Associação entre calibres arteriolar e venular, com aumento de 10 mmHg da pressão arterial média das 24 horas, diurna, e noturna e a pressão arterial aferida no momento da

retinografia, foi avaliada por análise de variância e análises multivariadas. **Resultados:** As médias da pressão arterial sistólica e diastólica das 24 horas, a diurna e noturna e foram inversamente associadas ao calibre arteriolar e RAV, mas não com calibre venular. A pressão arterial aferida no momento da obtenção da retinografia não teve associação com o calibre

dos vasos retinianos. **Conclusões:** A associação entre o calibre arteriolar dos vasos retinianos

e a pressão arterial não é influenciada pela variação instantânea da pressão arterial e, provavelmente, depende de lesões histológicas da parede arteriolar secundária à hipertensão sustentada.

## Abstract

**Objective:** To examine if the relationship between blood pressure and retinal arteriolar and venular caliber is influenced by blood pressure measured at the time of retinography acquisition. **Methods:** Retinal arteriolar caliber, venular caliber and arteriolar-to-venular ratio (AVR) were measured from digitized retinal photographs by the microdensitometric method in 448 patients with hypertension. All participants underwent 24-hour arterial blood pressure monitoring at the same day of the retinography. Association between arteriolar and venular calibers with increase of 10 mmHg in the 24 hour, daily, and nightly blood pressure, and blood pressure measured at the time of the retinography, was evaluated by ANOVA and multivariate analyses. **Results:** Mean 24 hours, daytime and nighttime systolic and diastolic blood pressure were inversely associated to arteriolar caliber and AVR, but not to venular caliber. Blood pressure measured at the time of the acquisition of the retinography was not associated with vessels caliber. **Conclusions:** The association between arteriolar retinal vessels caliber and blood pressure is not influenced by instantaneous variation of blood pressure and probably depends of histological damage of arteriolar wall secondary to sustained hypertension.

**Key Words:** Retinal vessels, diagnostic imaging, computer assisted, arterial blood pressure monitoring.

## **Introduction**

The classical studies linking abnormalities in retinal vessels diameters and hypertension were based on direct examination of optic fundi and in office blood pressure measurement.<sup>1</sup> The direct observation of retinal vessels is open to measurement bias<sup>2</sup>, and new methods of digital image processing of retinographies have improved the measurements of retinal vessels diameters and its prediction of cardiovascular disease<sup>3-6</sup>. The association between abnormalities of retinal vessels diameters and the incidence of cardiovascular events has been independent of blood pressure<sup>7, 8</sup> and have predicted even the incidence of hypertension.<sup>4</sup> Blood pressure in these epidemiological studies, however, was measured only at office and not by ambulatory blood pressure monitoring (ABPM). Overall, studies with blood pressure assessed by ABPM have been more precise to predict cardiovascular events<sup>9-11</sup> and are the only method to diagnose nightly and masked hypertension.<sup>12</sup> The possibility of residual confounding in epidemiological studies that used office blood pressure measurement cannot be fully ruled out. In those studies blood pressure and optic fundi examination were not done at the same time. Since the caliber of the vessels seen at the retinography probably corresponds to the vessel lumen, it is unclear if the diameter of retinal vessels can be modified only by abnormalities of vessel walls (histological ground) or if the diameter can be influenced by the state of vasoconstriction of retinal vessels (physiological ground).

The rationale of our study therefore includes to investigating the association of retinal vessel calibers and blood pressure assessed by ABPM at the time of the retinography acquisition and the association with the full 24 hours blood pressure measurement, in order to explore if there is a instantaneous association between blood pressure and retinal vessels diameters.

## **Methods**

### Study Population

This is cross-sectional study nested in the MONITOR study (Randomized clinical trial of efficacy of home blood pressure monitoring and target organ damage). The study was conducted in the Hypertension Clinic of the Division of Cardiology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, southern Brazil) between May 2006 and November 2008. Patients aged 18 to 80 years, with office blood pressure  $\geq 140/90$  mmHg, on treatment for hypertension were eligible whether they had 24-h ambulatory blood pressure monitoring (ABPM)  $\geq 130/80$  mmHg. The exclusion criteria encompassed severe hypertension (office BP  $\geq$

180/110 mmHg), secondary hypertension, severe chronic disease (cancer, liver cirrhosis, heart failure, unstable angina pectoris, mental disorders), and myocardial infarction or stroke within 6 months of enrollment. Patients provided free and informed consent, and the project was approved by the Ethics Committee of our Institution, which is accredited by the US Office of Human Research Protections as an Institutional Review Board.

### **Assessment of blood pressure**

All individuals were submitted to 24 hours ABPM using the equipment Spacelabs 90207 (Spacelabs, Redmond, WA). Readings were obtained automatically at intervals of 15 minutes during the day and 20 minutes on the night. Patients with less than 8 or 16 measures during the night and the day periods, respectively, were excluded from further analysis.<sup>13, 14</sup> Based on the results of ABPM, the mean 24-hour, daytime and nighttime systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were calculated for each patient. Blood pressure registered just before retinography acquisition was specifically recorded.

### **Retinal Photography and Measurement of Retinal Vascular Caliber**

Fundus photography was acquired after pharmacologic pupil dilation (20 min after instillation of tropicamine) using Topcon TVR-50 retinal camera (Topcon, Japan) in a 35-degree angle centered on the optic disc. The color slides were digitized in a 35-mm film scanner Hewlett Packard model Photo Smart 20S (Hewlett Packard, Andover, MA) with a resolution of 00 dots per inch. Images were stored in 24 bits (true color).

Retinography was obtained during the day of ABPM, usually between 11 am and 2 pm. The picture was taken just after a measurement of blood pressure.

Retinal vascular caliber was measured using an updated version of a computer-based program developed in our service (RAS, UFRGS - Brasil).<sup>3</sup> Briefly, at the opening of an image in the software, four concentric rings were automatically dropped over it. The inner circle measured the equivalent of 1800 micra (using the calibration factor of  $13.72\mu/\text{px}$ ), and it was centered at the optic disc head. The second, third, and fourth rings have one and a half, two, and three disc diameters, respectively. If, in case, the program had aligned the rings incorrectly at the optic disc, the operator could adjust them. Two concentric zones were delimited: the *inner zone* (A), ranging from one half of the disc diameter to one full disc diameter; and the *outer zone* (B), between one and two disc diameters from the margin (Figure 1).

Arteriolas, and venules as well, were marked 1 to 12 in the inner zone, and 13 to 24 in the outer zone. The vessels were also marked as pairs, according to proximity and bifurcation level, to calculate arteriolar to venular ratio (AVR). Once the user has provided a rectangular region of interest, the software computes the vessel boundaries (lumen) using the green channel of the retinographies (Figure 1) and the calibers measurements were exported to a database.

### Sample Size and Statistical Analysis

To detect a mean difference of 3 mmHg ( $\pm 6$  mmHg) in systolic pressure in ABPM between the groups with and without arteriolar narrowing, with a 90% power and alpha error of 0.05, a sample size of 86 patients will be needed. Our previous study was performed in 58 patients and was possible to test associations.

We used one-way ANOVA and linear regression models to explore the association between blood pressure and retinal vascular caliber, adjusting for age and gender. We also controlled for anatomy and measurement error including the fellow vessel caliber in the analyses.

Blood pressure parameters were: 24 hour, daytime, nighttime, and at the retinography, for systolic and diastolic blood pressures. Vascular calibers were summarized as mean arteriolar caliber, mean venular caliber, and mean AVR, for inner and outer zones, respectively, and were compared by 10 mmHg of incremental in blood pressure and by blood pressure divided in deciles.

Reproducibility of inter and intra grader agreement was tested by the intra class correlation coefficients.

All analyses were performed using SPSS (windows version 17.0: SPSS Inc., Chicago, IL).

## **Results**

Table 1 shows the characteristics of the study population. A total of 560 individuals were enrolled in the study. Of this 45 (8%) did not finish the evaluation and 67 (12%) had illegible retinography or unreliable ABPM.

Systolic blood pressure measured just before the retinography was  $9.4 \pm 16.1$  mmHg higher ( $P < 0.0001$ ) and diastolic blood pressure  $26.3 \pm 13.9$  mmHg higher ( $P < 0.0001$ ) than the respective 24 hours blood pressure. Systolic and diastolic blood pressure was not associated to any vascular caliber (Table 2).

Daytime and 24 hour blood pressure measurements yield significant associations with vessel calibers. As shown in table 2, systolic blood pressure was inversely associated to inner arteriolar caliber and inner AV ratio. Diastolic blood pressure was inversely associated with inner and outer arteriolar caliber (approximately 1 $\mu$ m decrease in caliber per 10mmHg increase of DBP), and also was associated to inner and outer AV ratio. Systolic nighttime blood pressure was inversely associated with inner arteriolar narrowing and diastolic nighttime blood pressure was inversely associated with inner and outer arteriolar caliber and inner AV ratio. Venular caliber was not associated to any of the blood pressure measurements.

The intraclass correlation coefficients for intergrader agreement were 0.98 (inner arteriolar diameter), 0.91 (outer arteriolar diameter), 0.99 (inner venular diameter) and 0.98 (outer venular diameter). For intragrader agreement these were 0.98, 0.95, 0.98 and 0.98 respectively.

## **Discussion**

To our knowledge this is the first report of an association between increasing of blood pressure measured by ABPM and narrowing of retinal arteriolar caliber. The association was found for an increase of 10 mmHg of 24-hour systolic blood pressure a decrease of 0.8  $\mu$ m in inner arteriolar caliber and 0,01 unit of inner AVR. For an increase of 10 mmHg of 24-hour diastolic blood pressure we found a decrease of 1.1  $\mu$ m in inner and outer arteriolar caliber and 0,01 unit of inner and outer AVR in patients with hypertension. Similar magnitudes of association were found for daytime and nighttime blood pressures. Venular calibers were not associated with increasing of blood pressure at any period of assessment.

Blood pressure measured at the time of retinography was not associated with arteriolar and venular calibers. The higher variability of only one blood pressure measurement done at this moment could yield no significant associations because of a beta error, but the caliber variation by 10 mmHg of blood pressure increasing were all close to null and the amplitude of confidence intervals were not substantially different from those observed for 24 hours, daily and nightly blood pressure. Taking together, these findings suggest that histological abnormalities prevail in the determination of the narrowing of the retinal arteriolar lumen, and that this association is not influenced by instantaneous blood pressure variation.

The absence of association between the instantaneous variation of blood pressure and arteriolar narrowing was somewhat expected. Retinal arterioles have no adrenergic

supply<sup>15</sup> and therefore may have their caliber mostly controlled by local autoregulation. Therefore, the association between retinal vessels abnormalities and chronic hypertension and its consequences is secondary to endothelial damage and probably to the reduction of the vascular lumen by arteriolar wall thickness. The more intense association of arteriolar narrowing with increasing in diastolic blood pressure, which is a function of peripheral arteriolar resistance, is in agreement with this interpretation.

Our study may be the first to report an association between blood pressure assessed by ABPM and retinal arteriolar diameter. Despite the smaller sample size and the cross-sectional design, these findings strengthen the evidence from larger cohort studies<sup>16-21</sup> linking retinal vessels calibers and abnormalities to cardiovascular events. Our findings confirm that this association is mainly dependent of abnormalities in arteriolar caliber, since there was no association between blood pressure and venular caliber.

In conclusion, the association between arteriolar retinal vessels caliber and blood pressure is not influenced by instantaneous variation of blood pressure and probably depends of histological damage of arteriolar wall secondary to sustained hypertension.



**Table 1** Characteristics of study population (n=448)

---

Age, y	57.9 ±12.0
Male sex, n (%)	149 (33%)
Inner Zone	
Arteriolar Caliber (μm)	105.1 ±11.3
Venular Caliber (μm)	129.1 ±14.6
AV Ratio	0.82 ±0.11
Outer zone	
Arteriolar Caliber (μm)	103.5 ±9.4
Venular Caliber (μm)	127.4 ±13.9
AV Ratio	0.82 ±0.11
Systolic Blood Pressure (mmHg)	
At retinography	144.6 ±23.5
24 hours	132.1 ±16.6
Daytime	135.5 ±16.7
Night time	125.2 ±18.5
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	
At retinography	107.6 ±18.2
24 hours	77.9 ±11.8
Daytime	81.4 ±12.3
Night time	70.9 ±12.5

---

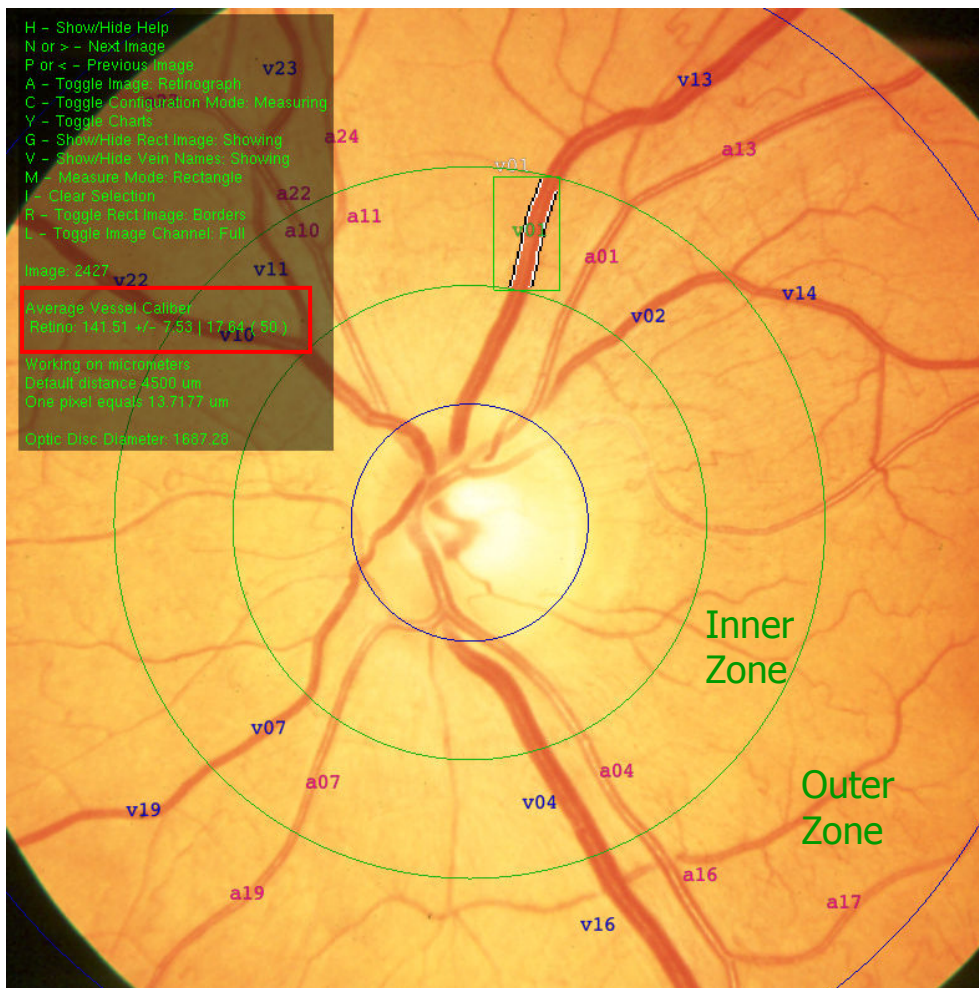
Data are given as mean ± SD or n (%).

AV ratio- Arteriolar to venular ratio

**Table 2.** Changes in retinal vessel calibers (95% confidence interval) per increase of 10-mmHg blood pressure, adjusted for age, fellow vessel and gender

<b>Systolic Blood pressure</b>								
<b>24 Hour</b>		<b>Daytime</b>		<b>Night Time</b>		<b>At retinography</b>		
	<b>Caliber (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>P value</b>	<b>Caliber (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>P value</b>	<b>Caliber (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>P value</b>	<b>Caliber (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>P value</b>
<b>Inner</b>								
Arteriola	-0.8 (-1.4 to -0.2)	0.01	-0.6 (-1.3 to -0.04)	0.04	-0.8 (-1.3 to -0.2)	0.007	-0.4 (-0.9 to 0.2)	0.2
Venula	0.4 (-0.4 to 1.2)	0.3	0.4 (-0.4 to 1.1)	0.4	0.03 (-0.5 to 1.0)	0.5	-0.09 (-0.8 to 0.6)	0.8
AV Ratio	-0.01 (-0.01 to -0.009)	0.03	-0.01 (-0.01 to -0.009)	0.02	-0.01 (-0.01 to 0.001)	0.1	-0.003 (-0.01 to 0.003)	0.4
<b>Outer</b>								
Arteriola	-0.5 (-1.1 to 0.02)	0.06	-0.5 (-1.0 to 0.06)	0.08	-0.5 (-1.0 to 0.02)	0.06	-0.3 (-0.7 to 0.2)	0.2
Venula	-0.03 (-0.9 to 0.8)	0.9	0.02 (-0.8 to 0.8)	1.0	-0.01 (-0.9 to 0.6)	0.7	-0.01 (-0.6 to 0.6)	1.0
AV Ratio	-0.004 (-0.01 to 0.003)	0.3	-0.004 (-0.01 to 0.003)	0.3	-0.003 (-0.01 to -0.003)	0.4	-0.003 (-0.01 to 0.002)	0.2
<b>Diastolic Blood pressure</b>								
<b>24 Hour</b>		<b>Daytime</b>		<b>Night Time</b>		<b>At retinography</b>		
	<b>Caliber (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>P value</b>	<b>Caliber (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>P value</b>	<b>Caliber (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>P value</b>	<b>Caliber (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>P value</b>
<b>Inner</b>								
Arteriola	-1.1 (-2.0 to -0.2)	0.02	-0.8 (-1.7 to 0.04)	0.06	-1.1 (-1.9 to -0.3)	0.01	-0.2 (-0.9 to 0.4)	0.5
Venula	1.0 (-0.2 to 2.2)	0.1	1.0 (-0.2 to 2.1)	0.1	0.6 (-0.5 to 1.7)	0.3	-0.2 (-1.1 to 0.7)	0.7
AV Ratio	-0.01 (-0.02 to 0.004)	0.007	-0.01 (-0.02 to 0.004)	0.008	-0.01 (-0.02 to 0.005)	0.03	-0.0007 (-0.01 to 0.01)	0.9
<b>Outer</b>								
Arteriola	-1.1 (-1.9 to -0.3)	0.01	-1.0 (-1.8 to -0.2)	0.01	-0.9 (-1.6 to -0.1)	0.03	-0.3 (-0.9 to 0.3)	0.3
Venula	0.5 (-0.7 to 1.7)	0.4	0.7 (-0.5 to 1.9)	0.2	0.05 (-1.1 to 1.2)	0.9	0.1 (-0.7 to 1.0)	0.8
AV Ratio	-0.01 (-0.02 to 0.004)	0.03	-0.01 (-0.02 to 0.002)	0.02	-0.01 (-0.02 to 0.003)	0.2	-0.004 (-0.01 to 0.003)	0.3

**Figure 1:** Retinal vessel measurements by RAS software: the inner circle is placed over the optic disc. The second, third, and fourth rings measuring one and a half, two and three disc diameters, respectively, are dropped over it creating the inner and outer zones. Arteriolas (a), and venulas (v) as well, are marked 1 to 12 in the inner zone, and 13 to 24 in the outer zone. User defines the rectangular region of interest (in green), and the software computes the vessel boundaries and displays the results (inside the red box). In this sample, venular #01 has a caliber of  $141,51 \pm 7,53 \mu\text{m}$  (total of 50 width measurements).



**References:**

1. Keith NM, Wagener HP, Barker NW. Some different types of essential hypertension: their course and prognosis. *Am J Med Sci.* 1939;197:332-343.
2. Maestri MM, Fuchs SC, Ferlin E, et al. Detection of Arteriolar Narrowing in Fundoscopic Examination: Evidence of a Low Performance of Direct Ophthalmoscopy in Comparison With a Microdensitometric Method[ast]. *Am J Hypertens.* 2007;20:501-505.
3. Pakter HM, Ferlin E, Fuchs SC, et al. Measuring arteriolar-to-venous ratio in retinal photography of patients with hypertension: development and application of a new semi-automated method. *Am J Hypertension.* 2005;18:417-421.
4. Wang JJ, Rochtchina E, Liew G, et al. The Long-term Relation among Retinal Arteriolar Narrowing, Blood Pressure, and Incident Severe Hypertension. *Am J Epidemiol.* 2008;168:80-88.
5. Wong TY, Klein R, Klein BEK. Retinal microvascular abnormalities and their relations with hypertension, cardiovascular diseases and mortality. *Surv Ophthalmol.* 2001;46:59-80.
6. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, et al. Retinal Arteriolar Narrowing and Risk of Diabetes Mellitus in Middle-aged Persons. *JAMA.* 2002;287:2528-2533.
7. Wong TY, Klein R, Nieto FJ, et al. Retinal microvascular abnormalities and 10-year cardiovascular mortality: A population-based case-control study. *Ophthalmology.* 2003;110:933-940.
8. Wong TY, Kamineni A, Klein R, et al. Quantitative Retinal Venular Caliber and Risk of Cardiovascular Disease in Older Persons: The Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med.* 2006;166:2388-2394.
9. Dolan E, Stanton A, Thijs L. Superiority of ambulatory over clinic blood pressure measurement in predicting mortality: the Dublin outcome study. *Hypertension.* 2005;46:156-161.
10. Staessen JA, Trip L, Fagard R. Predicting cardiovascular risk using conventional versus ambulatory blood pressure in older patients with systolic hypertension. The Systolic hypertension in Europe (Syst-Eur) trial investigators. *JAMA.* 1999;282:539-546.
11. Verdecchia P. Prognostic: Value of ambulatory blood pressure: current evidence and clinical applications. *Hypertension.* 2000;35:844-851.
12. Bobrie G, Chatellier G, Genes N, et al. Cardiovascular Prognosis of "Masked Hypertension" Detected by Blood Pressure Self-measurement in Elderly Treated Hypertensive Patients. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 2004;291:1342-1349.

13. Alessi A, Brandão A A, Pierin A. IV Guideline for ambulatory blood pressure monitoring. II Guideline for home blood pressure monitoring. *IV ABPM/II HBPM Arq Bras Cardiol.* 2005;85:1-18.
14. Ohkubo T, Imai Y, Tsuji I, et al. Reference Values for 24-Hour Ambulatory Blood Pressure Monitoring Based on a Prognostic Criterion : The Ohasama Study. *Hypertension.* 1998;32:255-259.
15. Laties AM. Central Retinal Artery Innervation: Absence of Adrenergic Innervation to the Intraocular Branches. *Archives of Ophthalmology.* 1967;77:405-409.
16. Duncan BB, Wong TY, Tyroler HA, Davis CE, Fuchs FD. Hypertensive retinopathy and incident coronary heart disease in high risk men. *British Journal of Ophthalmology.* 2002;86:1002-1006.
17. Kawasaki R, Cheung N, Wang JJ, et al. Retinal vessel diameters and risk of hypertension: the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of Hypertension.* 2009;27.
18. Liew G, Sharrett AR, Wang JJ, et al. Relative Importance of Systemic Determinants of Retinal Arteriolar and Venular Caliber: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Ophthalmol.* 2008;126:1404-1410.
19. Tanabe Y, Wang JJ, Wong TY, et al. Retinal arteriolar narrowing predicts 5-year risk of hypertension in Japanese people: the Funagata study. *Microcirculation.* 2010;17:94-102.
20. Wang JJ, Mitchell P, Leung H, Rochtchina E, Wong TY, Klein R. Hypertensive Retinal Vessel Wall Signs in a General Older Population: The Blue Mountains Eye Study. *Hypertension.* 2003;42:534-541.
21. Wong TY, Islam FMA, Klein R, et al. Retinal Vascular Caliber, Cardiovascular Risk Factors, and Inflammation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:2341-2350.

## 8 ARTIGO 4

### BLOOD PRESSURE CIRCADIAN RHYTHM AS MARKERS OF SUBCLINICAL ORGAN DAMAGE

**Journal:** European Heart Journal

**Authors:** Helena M. Pakter

Sandra C. Fuchs

Em nome dos pesquisadores do Estudo Monitor

## **Abstract**

**Objetivos:** Analisar o ritmo circadiano (RC) da pressão arterial (PA) e correlacioná-lo com o calibre dos vasos retinianos.

**Métodos e Resultados:** Estudo transversal realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Indivíduos hipertensos (n = 448) foram submetidos a 24 horas de monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA) e retinografia. O calibre arteriolar e venular retiniano foi aferido usando um método computadorizado, em duas zonas: zona interna de meio até um diâmetro do disco óptico e zona exterior de um a dois diâmetros do disco óptico. A ritmicidade foi avaliada através do método de Cosinor. Aproximadamente 80% dos indivíduos apresentaram RC. O calibre arteriolar interno foi significativamente diferente entre indivíduos com e sem RC. Pela análise de Cosinor de indivíduo o MESOR (média do ritmo ajustada estatisticamente) da pressão arterial sistólica e diastólica foi significativa e inversamente associada ao calibre arteriolar interno e externo e à razão artériola-venosa interior (RAV). A acrofase da PA Sistólica foi inversamente associado ao calibre arteriolar interno. Usando análise de Cosinor para população, indivíduos no primeiro quintil de calibre vascular foram comparados com os indivíduos nos demais quintis. As populações mostraram-se diferentes estatisticamente quanto ao parâmetro amplitude e calibre venular exterior e interior; e parâmetro acrofase e calibre venular interno.

**Conclusões:** O ritmo circadiano da pressão arterial está associados ao calibre vascular retiniano em pacientes hipertensos. Isto sugere que não só níveis da pressão arterial, mas também a amplitude e acrofase podem ser determinantes importantes de dano em órgão alvo.

## **Abstract**

**Aims:** To analyze the circadian rhythm (CR) of ambulatory blood pressure (BP) and to correlate it to retinal vessel caliber.

**Methods and Results:** Cross-sectional study conducted at Hospital de Clínicas Porto Alegre, Brazil. Hypertensive individuals (n=448) were submitted to 24h ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) and retinographs. We measured retinal arteriolar and venular caliber using a computer-assisted method in two zones: inner zone from one half to one disc diameter; and outer zone between one and two disc diameters. The rhythmicity was assessed by means of the Cosinor method. CR was present in approximately 80% of individuals. Inner arteriolar diameter was significantly different between individuals with and without CR. By individual Cosinor analysis we found systolic BP and diastolic BP MESOR (midline estimate statistic of rhythm) to be significantly and inversely associated with inner and outer arteriolar caliber and inner arteriolar-to-venular ratio (AVR). Systolic BP acrophase was inversely associated with inner arteriolar caliber. Using population Cosinor analysis to compare first to the other quintiles of vascular caliber we found significant differences in: amplitude and quintis of outer venular caliber and inner AVR; acrophase and inner venular calibers.

**Conclusions:** Blood pressure circadian rhythm was associated with retinal vascular caliber in hypertensive patients. This suggests that not only BP levels but also the amplitude and acrophase can be important determinants of end organ damage.

**Key Words:** Retinal vessels, diagnostic imaging, computer assisted, arterial blood pressure monitoring, circadian rhythm, cosinor.



Variation of chronobiological rhythms has been associated with several diseases.(1) Blood pressure has a typical circadian rhythm, with higher blood pressure while the individual is awake and with fall of blood pressure during sleep. The absence of nocturnal fall (non-dipping pattern) has been consistently associated with poor cardiovascular outcomes.(2-4) In these studies, the absence of non-dipping pattern has been characterized as percentage of fall below 10% ((5)). Another approach to describe the reduction of nocturnal fall takes into account the overall rhythm of blood pressure variation through COSINOR analysis.(6) COSINOR is a method of periodic regression analysis based on the adaptation of a cosine function, with a 24 h period to the raw, discrete 'within-day' BP values. There are few studies evaluating the association between absence of circadian rhythm assessed by COSINOR and cardiovascular outcomes or end-organ damage.

Retinal vessels offer a unique opportunity to investigate non-invasively the relationship of arteriolar and venular characteristics with hypertension. Several population-based studies have used computer-assisted imaging programs to assess retinal vessel caliber and were able to demonstrate a linear relationship between narrowing of small retinal arteries and arterioles and high blood pressure.(7-10) A novel insight from these studies showed that retinal arteriolar narrowing, possibly reflecting widespread systemic peripheral vasoconstriction and arteriosclerosis, is associated with increasing blood pressure that precedes hypertension.(11)

Despite the evidences of an association between retinal vessel abnormalities and hypertension, there are scarce studies on blood pressure rhythm and retinal abnormalities. Blood pressure has considerable beat-to-beat variability within 24 hours, rising steadily during the day and falling during the night, and 24 hour ambulatory blood pressure monitoring can capture its rhythmicity. Therefore, the purpose of this study was to analyze the circadian rhythm of 24 hours ambulatory blood pressure and to correlate it to retinal vessel caliber among hypertensive patients.

## **Patients and Methods**

### Study Population

This cross-sectional study was nested to the MONITOR study (Randomized clinical trial of efficacy of home blood pressure monitoring and target organ damage). The study was conducted in the Hypertension Clinic of the Division of Cardiology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, southern Brazil) between May 2006 and November 2009. Patients aged 18 to 80 years, with office blood pressure  $\geq 140/90$  mmHg or on treatment for hypertension were eligible. Exclusion criteria were severe hypertension (office BP  $\geq 180/110$  mmHg), secondary hypertension, severe chronic diseases (cancer, liver cirrhosis, heart failure, unstable angina pectoris, mental disorders), and myocardial infarction or stroke within 6 months of enrollment. Patients provided free and informed consent, and the project was approved by the Ethics Committee of our Institution, which is accredited by the US Office of Human Research Protections as an Institutional Review Board.

#### Ambulatory blood pressure measurements

All individuals performed ABPM with oscillometric equipment Spacelabs 90207 (Spacelabs, Redmond, WA), whose cuff was applied to the nondominant arm at the end of the visit, set to take a reading every 15-minutes throughout the day and 20 minutes at the night. ABPM was considered valid whether patients had at least 8 measurements at night and 16 during the day.(5, 12)

#### Retinal photography

After pharmacologic pupil dilation (20 min after instillation of tropicamide), retinography was obtained using Topcon TVR-50 retinal camera (Topcon, Japan) in a 35-degree angle centered in the optic disc. The color slides were digitized in a 35-mm film scanner Hewlett Packard model Photo Smart 20S (Hewlett Packard, Andover, MA) with a resolution of 600 dots per inch. Images were stored in 24 bits (true color). To enhance contrast of the retinal vessels against the retinal pigment epithelium, the green channel of the bitmap was selected.(9, 13) Retinographies were taken at the same day of the ABPM, at the same time of one of the measurements.

#### Image Processor software

Details of this microdensitometric method were reported.(9, 13) Briefly as the software opens an image, four concentric rings were automatically dropped over it. The inner circle measures the equivalent of 1,800 micra (using the calibration factor of  $13.72\mu/\text{px}$ ), and is centered at

the optic disc head. The first ring is center over the optic disc. The second, third, and fourth rings have half, one and two disc diameters, respectively. If, in case, the program aligns the rings incorrectly at the optic disc, the operator can adjust them. Two concentric zones are delimited: the *inner zone* (A), ranging from one half of the disc diameter to one full disc diameter; and the *outer zone* (B), between one and two disc diameters from the margin). Once the user has provided a rectangular region of interest, the software computes the vessel boundaries using the green channel of the retinographies. (Figure 1)

We measured the caliber of retinal arteriolas and venules and also calculate the mean arterio-to-venula ratio (AVR), in the inner and outer zones, of the right eyes of the subjects. When the right eye was unavailable or the image was poor the left eye was analyzed. Arteriolas (A) and venules (V) calibers were summarized as mean diameters for inner and outer zones and AV ratio (AVR).

### Cosinor Analysis

A chronobiometric approach was used to validate and describe the circadian rhythm (CR) that characterizes 24 hours BP variability. The rhythmicity was assessed by means of the Cosinor method(6), a method of periodic regression analysis based on the adaptation of a cosine function, with a 24 h period to the raw, discrete 'within-day' BP values. The Cosinor method allows validation of the statistical significance of the BP CR by verifying that the best-fitting oscillation is wide enough to reject the null-hypothesis of zero amplitude at a probability level of  $P < 0.05$  (rhythm significance level). The Cosinor method yields the following parameters of the validated CR: (1) the MESOR (an acronym for Midline Estimating Statistic of Rhythm), which is the rhythm-adjusted mean; (2) the amplitude, which corresponds to the oscillatory extent from the MESOR, being the difference between the maxim (or minimal) values and the MESOR; and (3) the acrophase, which describes, in hours and minutes, the time of day at which blood pressure circadian rhythm shows its highest elevation with respect to midnight (local time).

In this study we assumed the cosine function as:  $y_i = M + A \cos(\omega t_i - \varphi)$ , where  $y_i$  is the measure of blood pressure at time  $t_i$  in hours,  $i$  labels each measurement,  $M$  is the MESOR,  $A$  is the amplitude,  $\omega = 360^\circ/24h$  and is the circadian angular frequency, and  $\varphi$  is the acrophase.(6) Figure 2

### Statistical analysis

The cosinor analysis was performed using MATLAB 7.4. We use linear regression models to determine the association between single Cosinor analyses parameters and vascular calibers and blood pressure. Since the literature reports that age contribute to arteriolar caliber our results are adjusted to this variable. We also control for anatomy and measurement error including the fellow vessel caliber in the analyses.

The Cosinor population analysis is represented using a polar graphic. In this type of graph the distance of a point to the origin (designated by  $\gamma = \beta = 0$ ) determines the amplitude and its angle with respect to mid-night the acrophase. Thus, each point in the graph corresponds to the amplitude and the acrophase of a population. The circle around it represents the 95% confidence interval (CI), where the semi-axis along the angular direction is the acrophase CI and the semi-axis along the radial direction is the amplitude CI. Therefore if in a polar graph two (or more) circles do not overlap, their populations are statistically different.

## Results

Table 1 shows the characteristics of the study population. A total of 560 individuals were enrolled in the study. Of this 45 (8 %) did not finished the evaluation and 67 (12 %) had illegible retinography or unreliable ABPM. There were no significant differences regarding any BP Cosinor parameters or circadian rhythms between the included and excluded individuals due to unreadable retinography.

We first identify those individuals whose each of the blood pressure parameters show circadian rhythm (CR), using individual Cosinor analysis. In this study approximately 80% of cases showed CR. Only inner arteriolas diameters were significantly different between individuals with and without CR of the systolic blood pressure (Table 2).

By individual Cosinor analysis we found SBP and DBP MESOR to be significantly and inversely associated with inner and outer arteriolar caliber and inner AV ratio. DBP MESOR was also associated with outer AV ratio. SBP acrophase was inversely associated with inner arteriolar caliber. Amplitude was not associated with any vascular calibers. (Table 3)

After excluded the individuals that did not show CR, we performed population Cosinor analysis. For this analysis we rank vascular diameters into quintiles of arteriolar diameters, quintiles of venular diameters and quintiles of AVR. To determine if there is a difference

between the populations circadian rhythm we compare Cosinor parameters of blood pressure between first quintile and the other four quintiles of vascular calibers.

For the systolic blood pressure cosinor parameters we found that acrophase is significantly different for the populations with different quintiles of inner venular calibers and inner A-V ratio, while amplitude is different for outer venular caliber quintiles. (Figure 3)

For the diastolic blood pressure cosinor parameters we found that acrophase is significantly different for the populations with different quintiles of inner venular calibers, while amplitude is different for outer venular caliber quintiles. (Figure 4)

## **Discussion**

This paper presented an analysis of circadian rhythm of the blood pressure, measured by 24 hour ABPM, and its association with retinal vascular caliber, measured by a computer-assisted method. The Midline Estimating Statistics of Rhythm (MESOR) of blood pressure were significantly associated with arteriolar caliber, accounting for 0.5 to 1 micron of caliber reduction for every 10mmHg of systolic and diastolic increase in blood pressure. Venular caliber was not associated with MESOR. The cosinor analysis used to compare populations regarding the first quintile of vascular caliber *versus* the other four quintiles showed that there were differences in venular but not arteriolar calibers.

Cugini et al.(14) reported the elevation of both circadian blood pressure MESOR and amplitude, as occurring with minimal change in hypertensive retinopathy, assessed by ophthalmoscopy and photographic iconography. It is interesting to note that these subjects were considered to be normotensive at the casual Riva-Rocci sphygmomanometry but showed initial signs of hypertensive organ damage. At the cosinor analysis of the ABPM, those pre-hypertensive subjects had a well-phased BP circadian rhythm and an amplified oscillation in their 24-h blood pressure values. As mentioned by the authors, one of the greatest difficulties encountered in that study was the definition and ordering of the initial signs of hypertensive retinopathy. In fact, the signs were non-specific (i.e., not necessarily linked to hypertension) and not easily quantifiable.

To our knowledge there is no other study regarding the daily rhythm analysis of the blood pressure, by cosinor, and retinal vascular calibers, assessed by computer-assisted methods.

The literature has reported that the major systemic determinant of narrower retinal arteriolar caliber is higher blood pressure, while those of wider retinal venular caliber are smoking, high blood pressure, systemic inflammation, and obesity.(15) In accordance to these findings, we found that the midline estimated statistic of rhythm (MESOR) of blood pressure is associated with arteriolar caliber and not to venular caliber. In contrast, population blood pressure amplitude and acrophase were associated with venular calibers but not to arteriolar calibers. This could be translated as these parameters are not adequate to study the association between blood pressure and organ damage, or it could also mean that we should look to the rhythmic pattern of blood pressure in a differ manner in order to find associations between blood pressure and retinal venular calibers.

While we have chosen the frequency to be 24 hours, other studies have suggested to use other frequencies.(16) Sega et. al(17) study the rhythm of blood pressure by Fourier analyzes and showed that the 24 hours period is most important frequency to describing blood pressure variation.

One possible limitation of our study is that we used the clock hours of the day to set time zero of the cosine function (mid night) instead of using, for example, the bedtime. This may have reduced the population amplitude findings.

In this study, the only circadian rhythm parameter of blood pressure associated with arteriolar narrowing was the MESOR. Whether the circadian rhythm of blood pressure detected in the amplitude and acrophase of cosinor analysis were associated to venular caliber in further studies, it would imply in an alternatative way of dipping in the ABPM to evaluate blood pressure and end organ damage.

**Table 1** Characteristics of study population (n=448)

Age, years	57.9 ±12.0
Male gender, n (%)	149 (33%)
Inner Zone	
Arteriolar Caliber, μm	105.1 ±11.3
Venular Caliber, μm	129.1 ±14.6
AV Ratio, units	0.82 ±0.11
Outer zone	
Arteriolar Caliber, μm	103.5 ±9.4
Venular Caliber, μm	127.4 ±13.9
AV Ratio, units	0.82 ±0.11
Systolic Blood Pressure	
Daytime, mmHg	135.5 ±16.7
Night time, mmHg	125.2 ±18.5
Diastolic Blood Pressure	
Daytime, mmHg	81.4 ±12.3
Night time, mmHg	70.9 ±12.5

Data are represented in mean ± standard deviation.

**Table 2:** Mean and standard deviation for vessel caliber in individuals with and without circadian rhythm. Independent t-test.

<b>Systolic Blood Pressure (%)</b>	<b>With CR (78.6)</b>	<b>Without CR (21.4)</b>
Inner zone (Mean ±SD)		
Arteriola (µm)	104.7 ±10.1*	107.5 ±11.3
Venula (µm)	129.4 ±13.5	129.4 ±14.4
AV Ratio	0.82 ±10.3	0.83 ±13.4
Outer zone (Mean ±SD)		
Arteriola (µm)	103.2 ±9.0	104.4 ±10.3
Venula (µm)	127.4 ±13.5	127.7 ±15.2
AV Ratio	0.81 ±10.5	0.83 ±14.0
<b>Diastolic Blood Pressure (%)</b>	<b>With CR (80.6)</b>	<b>Without CR (19.4)</b>
Inner zone (Mean ±SD)		
Arteriola (µm)	105.5 ± 10.4	104.4 ± 10.8
Venula (µm)	129.4 ± 12.9	129.4 ± 13.9
AV Ratio	81.7 ±10.6	0.83 ±12.9
Outer zone (Mean ±SD)		
Arteriola (µm)	103.7 ± 9.3	102.6 ± 9.6
Venula (µm)	127.7 ± 14.1	126.4 ± 13.0
AV Ratio	0.81 ±11.2	82.5 ± 12.0

SBP – Systolic blood pressure, MBP – Mean blood pressure, DBP – Diastolic blood pressure, and CR circadian rhythm. \*p value =0,02



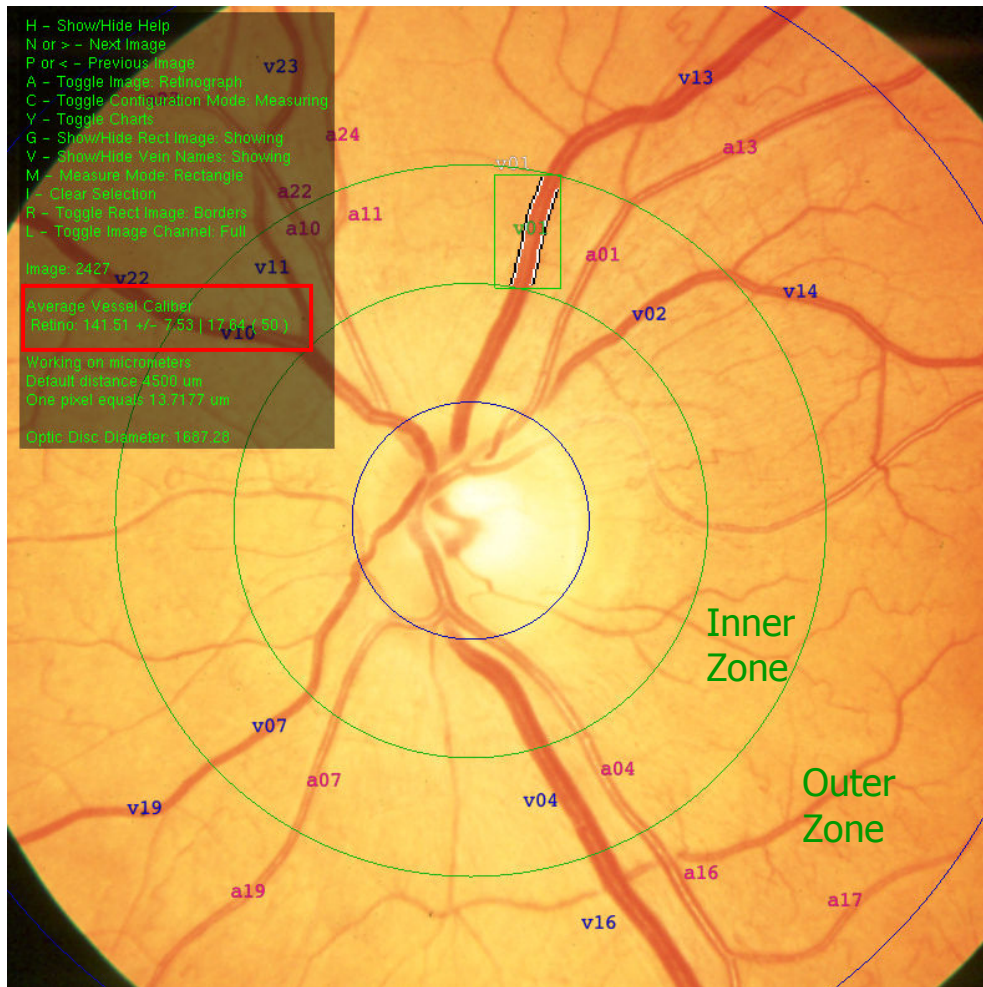
**Table 3:** Linear regression of individual Cosinor parameters as a function of vascular calibers adjusted to age and fellow vessel. Calibers are measured in micra, MESOR and amplitude in mmHg, and acrophase in hours. (95% confidence interval)

	ARTERIOLA		VENULA		AV RATIO	
	Inner	Outer	Inner	Outer	Inner	Outer
	<b>SBP</b>					
<b>MESOR</b>	-0.08* (-0.14 to -0.02)	-0.06# (-0.11 to -0.002)	0.05 (-0.04 to 0.12)	0.01 (-0.07 to 0.09)	-0.001‡ (-0.001 to 0.00008)	0.0004 (-0.001 to 0.0003)
<b>Acrophase</b>	0.2# (0.009 to 0.4)	0.09 (-0.09 to 0.3)	-0.002 (-0.3 to 0.3)	0.08 (-0.2 to 0.3)	0.0005 (-0.002 to 0.003)	0.001 (-0.002 to 0.003)
<b>Amplitude</b>	-0.07 (-0.3 to 0.1)	-0.04 (-0.2 to 0.1)	-0.07 (-0.3 to 0.1)	-0.12 (-0.4 to 0.1)	-0.001 (-0.003 to 0.001)	0.0003 (-0.002 to 0.002)
	<b>DBP</b>					
<b>MESOR</b>	-0.11† (-0.2 to -0.02)	-0.12+ (-0.2 to -0.04)	0.11 (-0.002 to 0.23)	0.08 (-0.04 to 0.2)	-0.001* (-0.002 to -0.0003)	-0.001* (-0.002 to -0.0003)
<b>Acrophase</b>	0.06 (-0.2 to 0.3)	0.02 (-0.2 to 0.3)	0.05 (-0.3 to 0.4)	0.06 (-0.3 to 0.4)	-0.001 (-0.004 to 0.002)	-0.001 (-0.004 to 0.002)
<b>Amplitude</b>	0.1 (-0.1 to 0.3)	0.01 (-0.2 to 0.2)	-0.001 (-0.3 to 0.3)	0.15 (-0.2 to 0.5)	-0.001 (-0.003 to 0.002)	-0.002 (-0.005 to 0.001)

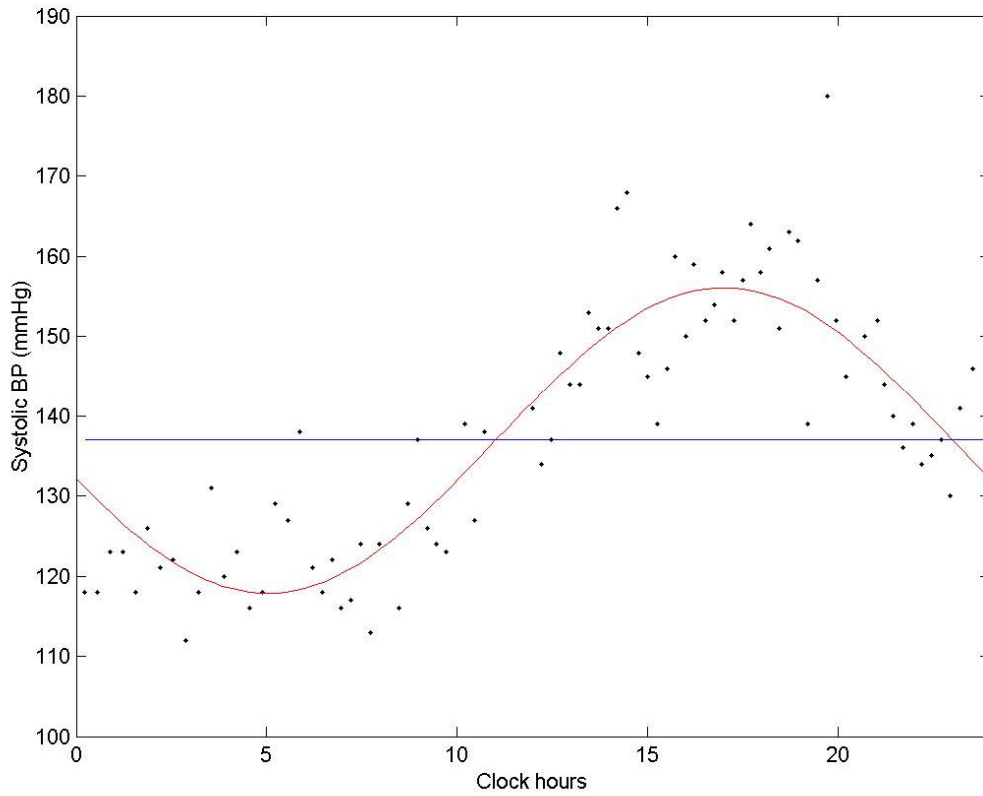
SBP – Systolic blood pressure and DBP – Diastolic blood pressure CI – Confidence Interval

\*p = 0.01 †p = 0.02 ‡p = 0.03 #p = 0.04 +p = 0.003

**Figure 1:** Retinal vessel measurements by RAS software: the inner circle is placed over the optic disc. The second, third, and fourth rings measuring one and a half, two and three disc diameters, respectively, are dropped over it creating the inner and outer zones. Arteriolas (a), and venules (v) as well, are marked 1 to 12 in the inner zone, and 13 to 24 in the outer zone. User defines the rectangular region of interest (in green), and the software computes the vessel boundaries and displays the results (inside the red box). In this sample, venular #01 has a caliber of  $141,51 \pm 7,53 \mu\text{m}$  (total of 50 width measurements).

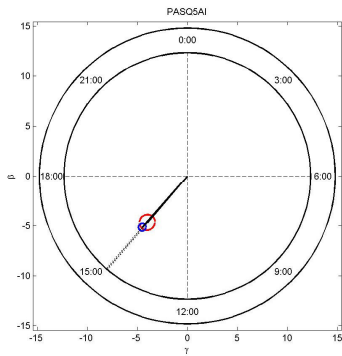


**Figure 2:** Individual cosinor analyses for 24 hour systolic blood pressure. The red line is the cosine function and the blue line is the mesor. In this case mesor = 137 mmHg, amplitude = 19,1 mmHg and acrophase is at 17 hours (5p.m.)

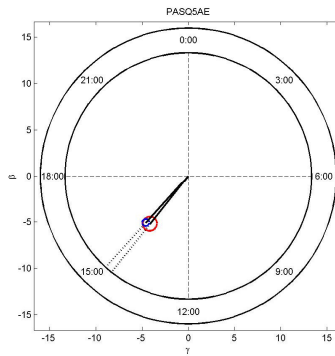


**Figure 3:** Polar graph showing the acrophase and the amplitude of systolic blood pressure in the two groups of vascular caliber (blue population is first quintile and red population is the second to last quintiles).

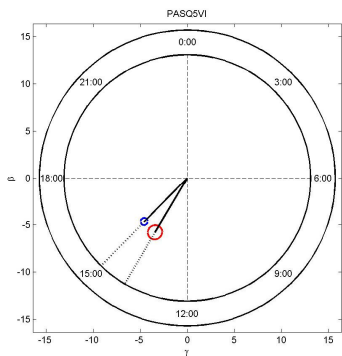
A. Inner Arteriola



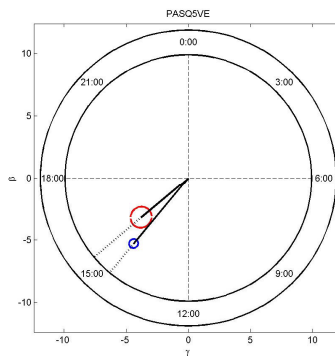
B. Outer Arteriola



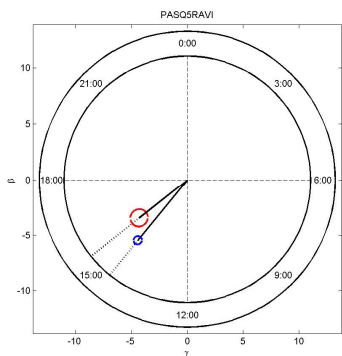
C. Inner Venula



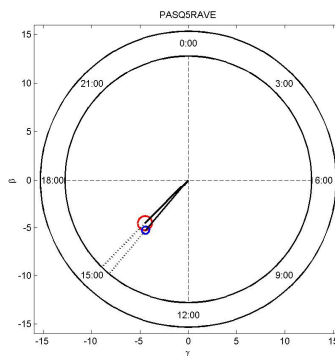
D. Outer Venula



E. Inner A-V Ratio

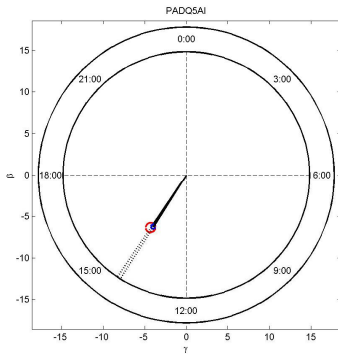


F. Outer A-V Ratio

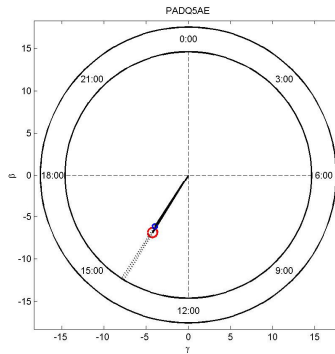


**Figure 4:** Polar graph showing the acrophase and the amplitude of diastolic blood pressure in the two groups of vascular caliber (blue population is first quintile and red population is the second to last quintiles).

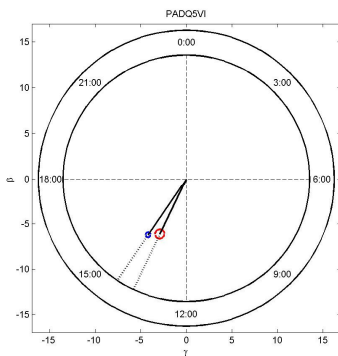
A. Inner Arteriola



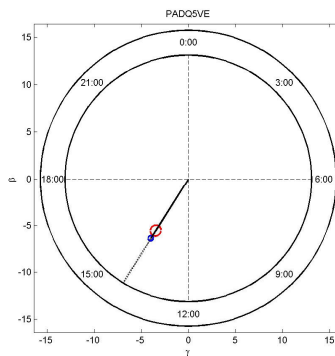
B. Outer Arteriola



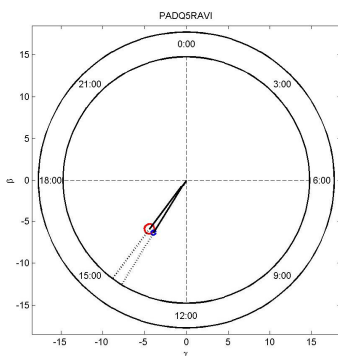
C. Inner Venula



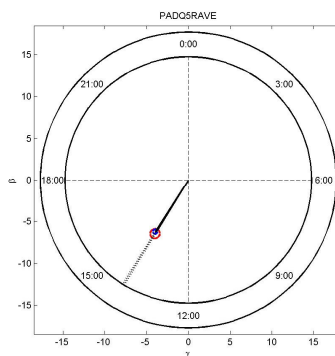
D. Outer Venula



E. Inner A-V Ratio



F. Outer A-V Ratio



## REFERENCES:

1. Rudic RD. Time Is of the Essence: Vascular Implications of the Circadian Clock. *Circulation* 2009;120(17):1714-1721.
2. Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Gattobigio R, Guerrieri M, Comparato E, Benemio G, Porcellati C. Altered circadian blood pressure profile and prognosis. *Blood Press Monit* 1997;2:347-352.
3. Shimada K, Kawamoto A, Matsubayashi K, Nishinaga M, Kimura S, Ozawa T. Diurnal blood pressure variations and silent cerebrovascular damage in elderly hypertensive patients. *J Hypertens* 1992;10:875-878.
4. Kikuya M, Ohkubo T, Asavama K. Ambulatory blood pressure and 10-year risk of cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Ohasama study. *Hypertens* 2005;45:240-245.
5. Alessi A, Brandão A A, Pierin A. IV Guideline for ambulatory blood pressure monitoring. II Guideline for home blood pressure monitoring. *IV ABPM/II HBPM Arq Bras Cardiol* 2005;85:1-18.
6. Halberg F. Chronobiology. *Annual Review of Physiology* 1969;31(1):675-726.
7. Smith W, Wang JJ, Wong TY, Rochtchina E, Klein R, Leeder SR, Mitchell P. Retinal Arteriolar Narrowing Is Associated With 5-Year Incident Severe Hypertension: The Blue Mountains Eye Study. *Hypertension* 2004;44(4):442-447.
8. Sharrett AR, Hubbard LD, Cooper LS, Sorlie PD, Brothers RJ, Nieto FJ, Pinsky JL, Klein R. Retinal Arteriolar Diameters and Elevated Blood Pressure: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1999;150(3):263-270.
9. Pakter HM, Ferlin E, Fuchs SC, Maestri MK, Moraes RS, Moreira LB, Gus M, Fuchs FD. Measuring arteriolar-to-venous ratio in retinal photography of patients with hypertension: development and application of a new semi-automated method. *Am J Hypertension* 2005;18:417-421.
10. Kawasaki R, Cheung N, Wang JJ, Klein R, Klein BE, Cotch MF, Sharrett AR, Shea S, Islam FA, Wong TY. Retinal vessel diameters and risk of hypertension: the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of Hypertension* 2009;27(12).
11. Wang JJ, Rochtchina E, Liew G, Tan AG, Wong TY, Leeder SR, Smith W, Shankar A, Mitchell P. The Long-term Relation among Retinal Arteriolar Narrowing, Blood Pressure, and Incident Severe Hypertension. *Am J Epidemiol* 2008;168(1):80-88.
12. Ohkubo T, Imai Y, Tsuji I, Nagai K, Ito S, Satoh H, Hisamichi S. Reference Values for 24-Hour Ambulatory Blood Pressure Monitoring Based on a Prognostic Criterion : The Ohasama Study. *Hypertension* 1998;32(2):255-259.
13. Maestri MM, Fuchs SC, Ferlin E, Pakter HM, Nunes G, Moraes RS, Gus M, Moreira LB, Fuchs FD. Detection of Arteriolar Narrowing in Fundoscopic Examination: Evidence of a Low Performance of Direct Ophthalmoscopy in Comparison With a Microdensitometric Method[ast]. *Am J Hypertens* 2007;20(5):501-505.
14. Cugini P, Cruciani F, Turri M, Regine F, Gherardi F, Petrangeli C, Gabrieli C. 'Minimal-change hypertensive retinopathy' and 'arterial pre-hypertension', illustrated via

ambulatory blood-pressure monitoring in putatively normotensive subjects. *International Ophthalmology* 1998;22(3):145-149.

15. Sun C, Wang JJ, Mackey DA, Wong TY. Retinal Vascular Caliber: Systemic, Environmental, and Genetic Associations. *Survey of Ophthalmology* 2001;54(1):74-95.
16. Fernández JR, Mojón A, Hermida RC. Comparison of Parameters from Rhythmometric Models with Multiple Components on Hybrid Data. *Chronobiology International: The Journal of Biological & Medical Rhythm Research* 2004;21(3):469-484.
17. Sega R, Corrao G, Bombelli M, Beltrame L, Facchetti R, Grassi G, Ferrario M, Mancia G. Blood Pressure Variability and Organ Damage in a General Population: Results from the PAMELA Study. *Hypertension* 2002;39(2):710-714.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos quatro artigos desta Tese foi possível demonstrar que:

1. O fator de escala incorporado ao software Retinal Assessment System (RAS) é essencial para que se possa obter valores absolutos das medidas dos calibre vasculares retinianos e pode ser obtido por medidas feita por indivíduo não oftalmologista treinado para este fim.
2. Através do software RAS podemos medir de forma acurada e reproduzível o lúmen dos vasos retinianos.
3. Não há associação entre calibre vascular retiniano e a pressão arterial medida no mesmo momento da realização da retinografia, assim a associação entre calibre vascular retiniano e pressão arterial não é influenciada pela variação instântanea da pressão arterial, e provavelmente depende de lesão na parede arteriolar secundária a hipertensão sustentada.
4. A diminuição do calibre arteriolar retiniano está associada a um aumento na pressão arterial sistólica e diastólica medida através da monitorização ambulatória da pressão arterial, e que nenhum parâmetro da MAPA está associado ao calibre venular retiniano.
5. Através da análise do ritmo circadiano da pressão arterial demonstramos associação entre calibre arterial retiniano e MESOR da pressão arterial sistólica e diastólica, que é a média ajustado do ritmo da pressão arterial. Comparando populações com diferentes quintis de calibre vascular retiniano observamos que a amplitude e a acrofase da pressão arterial difere significativamente entre indivíduos no primeiro e demais quintis de calibre venular, e não arteriolar, retiniano.



## **ANEXO I**

### TERMO DE CONSENTIMENTO

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

### ESTUDO MONITOR

Nós gostaríamos de convidar você para participar de um estudo que estamos realizando. Todos os dias chegam aos hospitais e ambulatórios de Porto Alegre muitos pacientes para realizar avaliação e tratamento para pressão alta. No nosso ambulatório, todos os pacientes realizam três consultas para confirmar o diagnóstico de hipertensão, uma avaliação ambulatorial da pressão arterial de 24 horas (Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial) e exames laboratoriais com coleta de sangue (5 ml) para detectar doenças associadas à elevação de pressão. Além disso, os pacientes recebem recomendações sobre perda de peso, dieta e para fazer atividade física e, quando necessário, tratamento com medicamentos para controlar a hipertensão. Apesar das orientações e dos médicos prescreverem medicamentos para reduzir a pressão, por motivos diversos, o controle da pressão não é adequado em muitos casos.

Nós estamos interessados em acompanhar o tratamento dos pacientes para saber qual a melhor forma de controlar a hipertensão. Para isto estamos convidando os pacientes com pressão alta em uso de medicamentos para participarem do estudo. Na primeira etapa desse estudo, o paciente receberá o atendimento normalmente oferecido pelo médico no consultório e, além disso, fará uma avaliação e receberá outras orientações relacionadas ao controle da pressão alta. Todos os pacientes terão medido peso, altura, circunferência da cintura e farão os exames de rotina que o médico solicita durante a avaliação, retirando um pouco de sangue a mais (5 ml) para detectar a presença de uma substância (adiponectina) que pode ter relação com problemas cardiovasculares.

Além da monitorização ambulatorial da pressão de 24 horas, os pacientes realizarão a avaliação do tamanho e funcionamento do coração através de ecocardiografia, exame realizado em pacientes com pressão alta em investigação para doenças relacionadas à hipertensão. O exame não causa dor ou desconforto, permite visualizar o coração através do peito. Você também fará exame para verificar se a pressão arterial causou algum dano nas artérias e veias dos olhos. Isso é feito através de uma retinografia, que é uma fotografia dos

seus olhos. A realização do índice tornozelo-braquial, outra medida de pressão, realizada no braço e na perna, permite verificar se as pressões são equivalentes. O conjunto de procedimentos permitirá verificar as repercussões da pressão arterial sobre o funcionamento de alguns órgãos do seu corpo.

Assim, se você preencher os critérios de inclusão e concordar em participar da segunda etapa do estudo, você será sorteado para participar de um de quatro grupos do estudo. O sorteio para participar significa que nem você nem o médico podem escolher o grupo. Isso é necessário para o sucesso do estudo. No primeiro grupo os pacientes receberão orientação sobre o tratamento e voltarão em uma semana, 30 dias e 60 dias. No segundo grupo, além de receber as mesmas orientações, os pacientes serão treinados para medir a pressão com um aparelho automático, em casa. O paciente levará o aparelho para casa para medir a pressão duas vezes por dia, duas vezes de cada vez, por 60 dias. Ao final da primeira semana e ao final de 30 dias voltará ao hospital para verificar se fez as medidas conforme a orientação e, em 60 dias retornará ao ambulatório para a entrega do aparelho. No terceiro grupo, o paciente receberá adicionalmente quatro consultas com um farmacêutico para receber orientações sobre a medicação, retornando em 7 dias, 30 e 60 dias como nos outros grupos. O quarto grupo receberá o aparelho, conforme descrito acima, e fará as consultas com o farmacêutico.

O treinamento para usar o aparelho será feito pelo médico no mesmo dia da consulta e um familiar também poderá aprender. Os pacientes que participarem do estudo receberão atendimento e serão acompanhados no ambulatório de hipertensão deste hospital, da mesma maneira que são atendidos os demais pacientes. Todos os pacientes farão avaliação inicial com medida da pressão arterial através de monitorização ambulatorial da pressão arterial de 24 horas para continuar o diagnóstico de hipertensão arterial, com um aparelho que mede automaticamente a pressão, a cada 20 minutos durante o dia e 30 minutos durante a noite. Durante essas 24 horas o aparelho não pode ser retirado nem para tomar banho.

Se você decidir participar estará colaborando para que os médicos possam auxiliar o paciente a controlar a hipertensão. Assim, além dos resultados dessa pesquisa beneficiarem o seu tratamento, os médicos poderão orientar os demais pacientes a manter a pressão o mais próximo do normal.

Se você decidir não participar, você será atendido por seu médico da mesma maneira que os pacientes em geral são atendidos. Se você mudar de ideia durante o estudo e decidir não participar, não haverá problemas, mas você deverá comunicar alguém da pesquisa. Se você tiver alguma dúvida pode perguntar antes de se decidir.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo são: Prof. Flávio D. Fuchs, Profª. Drª. Leila B. Moreira e Profª. Dra. Sandra Costa Fuchs que poderão ser contatados pelos telefones 2101-8420 (Dr. Flávio), 2101-7695 (Drª. Leila), 210 1-7621 (Drª. Sandra).

O Senhor (a) concorda em participar?

Declaro que me foram dadas as informações descritas acima e que concordo em participar do estudo.

---

Participante

---

Pesquisador

Data: \_\_/\_\_/200\_\_

## ANEXO II

### Projeto de pesquisa

Programa de Pós-graduação em Epidemiologia  
Projeto de Pesquisa – Doutorado  
Pressão arterial e alterações vasculares retinianas

Candidata: Helena Messinger Pakter

Orientador: Sandra Costa Fuchs

#### 1. Justificativa

---

Estima-se que 16 a 70% da população adulta mundial apresente hipertensão arterial<sup>1-</sup><sup>16</sup>. Destaca-se prevalência particularmente elevada em populações constituídas por indivíduos idosos. Nos estudos que incluem adultos jovens a prevalência de hipertensão varia entre 20% e 30%, dependendo do critério diagnóstico utilizado. Além da idade<sup>2,11</sup>, raça negra<sup>18</sup>, menor escolaridade<sup>9,17,18</sup>, grau de urbanização<sup>4,9</sup>, excesso de peso<sup>2,18</sup> e obesidade<sup>2,9</sup> são outros fatores que influenciam as taxas de prevalência de hipertensão. Observa-se ainda que cerca de metade a dois terços dos indivíduos com hipertensão arterial desconhecem a condição de hipertensos e apenas um quinto possui pressão inferior a 140 mm Hg e 90 mm Hg.

No Brasil, na última década foram realizados diversos inquéritos populacionais em amostras representativas, que indicam variações na prevalência de hipertensão arterial entre 22% e 44%<sup>19-24</sup>. Dois estudos transversais, adequadamente conduzidos, realizados em indivíduos adultos estimaram em 11% a prevalência de hipertensão arterial no Rio Grande do Sul<sup>25</sup> e 12,9% em Porto Alegre (pressão arterial  $\geq$  160/95 mm Hg)<sup>26</sup>. A análise de dois estudos transversais realizados em Porto Alegre, com um intervalo de aproximadamente cinco anos sugere que as taxas de prevalência de hipertensão, segundo o critério  $\geq$ 140/90 mm Hg, mantiveram-se estáveis (26% vs. 29%)<sup>20,26</sup>.

O controle inadequado da hipertensão arterial causa dano na microcirculação retiniana, e assim o reconhecimento da retinopatia hipertensiva pode ser importante na estratificação de risco cardiovascular de pacientes hipertensos. No entanto não há uma classificação ou definição para retinopatia hipertensiva largamente aceita. Varias diretrizes internacionais não concordam entre si. Por exemplo na tabela de estratificação de risco da European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines (ESH-ESC 2003)<sup>30</sup> indica que retinopatia hipertensiva graus III e IV (como definido na tabela 1) estão associadas com condições clínicas, enquanto o Joint National Committee on Prevention,

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VII) dos Estados Unidos indica retinopatia genericamente (sem mencionar grau) como lesão a órgão alvo.<sup>31</sup> Além disso a publicação da organização mundial de saúde - International Society of Hypertension (WHO-ISH) 2003<sup>32</sup> e a British Hypertension Society 2004 Guidelines (BHS IV)<sup>33</sup> considera retinopatia como lesão a órgão alvo, no entanto novamente somente para graus III e IV.

**Tabela 1:** Classificação dos achados fundoscópicos em pacientes com hipertensão arterial segundo Keith, Wagner e Baker<sup>34</sup>.

<b>Grau</b>	<b>Achados Fundoscópicos</b>
Grau 1	estreitamento leve a moderado ou esclerose das arteríolas
Grau 2	estreitamento moderado a grave das arteríolas, estreitamento local ou generalizado das arteríolas, aumento do reflexo da luz, alterações dos cruzamentos artério-venosos
Grau 3	estreitamento arteriolar retiniano e constrição focal, edema retiniano, exudatos algodinosos, hemorragia
Grau 4	estreitamento arteriolar retiniano e constrição focal, edema retiniano, exudatos algodinosos, hemorragia e edema de papila

Vários estudos recentes tem mostrado que alterações microvasculares retinianas podem ser documentados com fotografias retinianas.<sup>35-42</sup> Além disso estes estudos sugerem que estreitamento arteriolar generalizado pode ser aferido através do diâmetro dos vasos retinianos medido por software de imagem. O desenvolvimento de software específicos têm possibilitado a medida objetiva da razão arterio venosa em regiões selecionadas da retina.<sup>35-36</sup> Estas técnicas tem apresentado boa reprodutibilidade (coeficiente de correlação intraclasse varia de 0.80-0.90)<sup>35,39-42</sup> Estudo realizado em Porto Alegre, desenvolveu software para avaliar razão arterio venosa retiniana. Este método apresentou uma correlação muito boa com o método tradicional (avaliação feita através da projeção em tela das retinografias e mensuração dos vasos com régua) e elevada reprodutibilidade (coeficiente de correlação intraclasse intra-observador foi 0,94 (P < 0,0001) interobservador foi 0,88 (valor P = 0,0004)) Além disso foi possível confirmar uma associação significativa e inversa da pressão arterial sistólica com a razão arteriovenosa, independentemente da idade (para cada incremento de 10 mm Hg na pressão sistólica a razão arteriovenosa diminuiu 0,02 unidades).<sup>43</sup>

Estreitamento arteriolar generalizado, um dos sinais retinianos precoces de hipertensão arterial,<sup>38,43-46</sup> associa-se também à doença coronariana em mulheres (razão de chances 2,3; intervalo de confiança 95% 1,0 a 4,6) mas não em homens (razão de chances 1,1; intervalo de confiança 95% 0,7 a 1,8)<sup>47</sup>, associa-se também à doença coronariana em

homens com hipertensão e dislipidemia<sup>48</sup> e estava independentemente associado com aumento de risco para diabetes mellitus tipo II (razão de chances 1,71; intervalo de confiança 1,13 a 2,57).<sup>49</sup> Em um estudo de caso controle aninhado em estudo de pacientes com doença ocular relacionada a idade (Beaver Dam Eye Study) estreitamento arteriolar, microaneurismas e hemorragias retinianas estavam associados com aumento de risco de mortalidade por acidente vascular cerebral em 10 anos.<sup>50</sup>

## 2. Objetivos

---

Avaliar a associação entre os parâmetros do monitoramento ambulatorial da pressão arterial (MAPA) sobre e o calibre dos vasos retinianos, medidos através de retinografia analisada pelo método microdensitométrico, em pacientes com hipertensão arterial .

Avaliar a associação entre a pressão arterial no momento da retinografia e o calibre dos vasos retinianos de pacientes com hipertensão arterial.

Avaliar a associação entre o ritmo da pressão arterial e o calibre dos vasos retinianos de pacientes com hipertensão arterial .

## 3. Métodos

---

Pacientes atendidos em ambulatório de referência, com idade entre 30 e 69 anos, de ambos os sexos, com hipertensão arterial (pressão  $\geq 140/90$  mm Hg, média de seis aferições) e em uso de medicamentos anti-hipertensivos serão elegíveis para o estudo. Todos os pacientes realizarão seis medidas da pressão através de manômetro aneróide no consultório e aqueles com hipertensão arterial serão submetidos à monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA) de 24 horas. Pacientes com valores anormais de pressão arterial no consultório (igual ou acima de 140/90 mm Hg) e MAPA de 24 horas ( $> 130/80$  mm Hg) serão convidados a participar do ensaio clínico randomizado. Aqueles que, lendo o termo de consentimento livre e esclarecido, concordarem em participar assinarão o termo de consentimento e serão randomizados para um dos grupos.

Pacientes com valores anormais da pressão arterial no consultório (igual ou acima de 140/90 mm Hg) e valores normais de pressão arterial pela MAPA (igual ou abaixo de 130/80 mm Hg) caracterizam um grupo de pacientes que apresentam o efeito do avental branco. Estes pacientes apresentam diferença superior a 20 mm Hg na pressão sistólica e 10 mm Hg na pressão diastólica entre a medida da pressão arterial no consultório e a da MAPA na vigília, sem haver mudança no diagnóstico de normotensão ou hipertensão. Estes pacientes são portadores de hipertensão do avental branco e não serão elegíveis para o estudo.

Os pacientes serão avaliados para a presença de lesão em órgão alvo conforme as diretrizes da Sociedade Brasileira de Hipertensão<sup>54</sup> e a mesma avaliação será repetida ao final do ensaio clínico 90 dias após a randomização. A avaliação inclui ecocardiografia para determinação da massa ventricular esquerda, microalbuminúria, retinografia para determinação de estreitamento arteriolar, além da MAPA<sup>55</sup>. A retinografia será realizada simultaneamente a MAPA. Entrevista detalhada será realizada por entrevistadores treinados, para coleta de dados sobre fatores de risco para hipertensão, co-morbidades, padrão alimentar e atividade física<sup>20,26,29,51</sup>. Todos os pacientes receberão recomendações para manter ou perder peso, de acordo com índice de massa corporal; reduzir o consumo de sal na dieta, praticar atividade física regularmente (pelo menos 30 minutos na maior parte dos dias da semana), além de tomar os medicamentos anti-hipertensivos nas doses e intervalos prescritos.

#### Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo de tamanho de amostra foi feito para detectar uma diferença média de 3 mmHg ( $\pm 6$  mm Hg) na pressão sistólica na MAPA entre os grupos com e sem estreitamento arteriolar, considerando um poder de 90% e erro alfa de 0,05, serão necessários 86 pacientes. Nosso estudo prévio foi realizado em 58 pacientes e foi possível testar as associações.

#### Planejamento da análise

Banco de dados será criado em epinfo 2000 para digitação das informações coletadas em entrevista, exames laboratoriais e MAPA. Análise estatística será feita em SPSS.

#### 4. Cronograma

---

	Meses do estudo				
	0	1-6	7-24	24-36	36-48
Desenho do projeto	X				
Desenvolvimento de instrumentos		X			
Execução			X		

Análise dos dados				X	X
Redação dos artigos				X	X

## 5. Questões Éticas

---

O projeto encontra-se em avaliação pela Comissão de Ética em Pesquisa do GPPG do HCPA.

## 6. Orçamento

---

Este projeto terá financiamento do CNPq e da FAPERGS.

## 7. Referências

---

1. Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Ruilope LM, Graciani A, Luque M, de la Cruz-Troca JJ, et al. Hypertension magnitude and management in the elderly population of Spain. *J Hypertens* 2002; 20(11):2157-64.
2. Jo I, Ahn Y, Lee J, Shin KR, Lee HK, Shin C. Prevalence, awareness, treatment, control and risk factors of hypertension in Korea: the Ansan study. *J Hypertens* 2001;19(9):1523-32.
3. Stein AD, Stoyanovsky V, Mincheva V, Dimitrov E, Hodjeva D, Petkov A, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in a working Bulgarian population. *Eur J Epidemiol* 2000;16(3):265-70.
4. Pan WH, Chang HY, Yeh WT, Hsiao SY, Hung YT. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Taiwan: results of Nutrition and Health Survey in Taiwan (NAHSIT) 1993-1996. *J Hum Hypertens* 2001;15(11):793-8.
5. Stergiou GS, Thomopoulou GC, Skeva II, Mountokalakis TD. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in Greece: the Didima study. *Am J Hypertens* 1999; 12(10 Pt 1):959-65.
6. Bharucha NE, Kuruvilla T. Hypertension in the Parsi community of Bombay: a study on prevalence, awareness and compliance to treatment. *BMC Public Health*. 2003; 6;3(1):1.
7. Gu D, Reynolds K, Wu X, Chen J, Duan X, Muntner P, et al. InterASIA Collaborative Group. The International Collaborative Study of Cardiovascular Disease in ASIA. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in China. *Hypertension* 2002;40(6):920-7.



8. Kalavathy MC, Thankappan KR, Sarma PS, Vasan RS. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in an elderly community-based sample in Kerala, India. *Natl Med J India* 2000;13(1):9-15.
9. Hypertension Study Group. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension among the elderly in Bangladesh and India: a multicentre study. *Bull World Health Organ* 2001; 79(6): 490 - 500.
10. Prencipe M, Casini AR, Santini M, Ferretti C, Scialfaferri N, Culasso F. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in the elderly: results from a population survey. *J Hum Hypertens* 2000; 14(12):825-30.
11. Tugay Aytekin N, Pala K, Irgil E, Akis N, Aytekin H. Distribution of blood pressures in Gemlik District, north-west Turkey. *Health Soc Care Community* 2002;10(5):394-401.
12. Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, de la Cruz Troca JJ, Guallar-Castillon P, del Rey Calero J. Blood pressure in Spain: distribution, awareness, control, and benefits of a reduction in average pressure. *Hypertension* 1998; 32(6):998-1002.
13. Zdrojewski T, Pienkowski R, Szykiewicz M, Krupa-Wojciechowska B. Have rapid socioeconomic changes influenced awareness of blood pressure in Poland? *J Hum Hypertens* 2001;15(4):247-53.
14. Shipp ML. Awareness status and prevalence of hypertension in a group of urban Haitians: findings of a population-based survey. *Ethn Dis* 2001;11(3):419-30.
15. Swami HM, Bhatia V, Gupta M, Bhatia SP, Sood A. Population based study of hypertension among the elderly in northern India. *Public Health* 2002;116(1):45-9.
16. Hajjar I, Kotchen TA. Trends in Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in the United States, 1988-2000. *Jama* 2003; 290(2): 199-206.
17. Kim JS, Song WH, Shin C, Park CG, Seo HS, Shim WJ, et al. The prevalence and awareness of hypertension and the relationship between hypertension and snoring in the Korean population. *Korean J Intern Med* 2001;16(2):62-8.
18. Freitas OC, Resende CF, Marques NJ, Veludo PK, Perreira RS, Gonçalves RM, et al. Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of São Paulo, Brazil. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77 (1): 16 – 21.
19. Fuchs FD, Moreira LB, Moraes RS, Bredemeier M, Cardoso SC. Prevalência de hipertensão arterial sistêmica e fatores associados na região urbana de Porto Alegre: estudo de base populacional. *Arq Bras Cardiol* 1995; 63 (6): 473-9.
20. Lolio CA. Prevalência de hipertensão arterial em Araraquara. *Arq Bras Cardiol* 1990; 55(3): 167-73.
21. Martins IS, Marucci MF; Velásquez-Melendez G, Coelho LT, Cervato AMI. Doenças cardiovasculares ateroscleróticas, dislipidemias, hipertensão, obesidade e diabetes

- melito em população da área metropolitana da Região Sudeste do Brasil. III – Hipertensão. *Rev Saúde Pública* 1997; 31 (5):466-71.
22. Rego RA, Berardo FA, Rodrigues SS, Oliveira ZM, Vasconcellos C, Aventurato LV, et al. Risk factors for chronic non-communicable diseases: a domiciliary survey in the municipality of São Paulo, SP (Brazil). Methodology and preliminary results. *Rev Saúde Pública* 1990; 24 (4): 277 – 85.
  23. Ayres JE. Prevalence of hypertension in the city of Piracicaba. *Arq Bras Cardiol* 1991; 57 (1):33-6.
  24. Achutti A, Medeiros AM. Hipertensão arterial no Rio Grande do Sul. *Bol Saúde, Porto Alegre* 1985; 12: 6-54.
  25. Fuchs SC, Petter JG, Accordi, MC et al. Establishing the prevalence of hypertension. Influence of sampling criteria. *Arq. Bras. Cardiol* 2001, 76(6):449-452.
  26. Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Nefrologia. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial 2002.
  27. National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Jama* 2003; 289(19): 2560-2572.
  28. Dias da Costa JS, Fuchs SC, Olinto MT, Gigante DP, Menezes AM, Macedo S, Gehrke S. Cost-effectiveness of hypertension treatment: a population-based study. *Sao Paulo Med J.* 2002 Jul 4;120(4):100-4.
  29. Fuchs FD, Gus M, Moreira WD, Moreira LB, Moraes RS, Rosito GA, Sorucco A, Atanazio P, Machado R. Blood pressure effects of antihypertensive drugs and changes in lifestyle in a Brazilian hypertensive cohort. *J Hypertens.* 1997 Jul;15(7):783-92.
  30. Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension/ European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertension* 2003;21:1011–53.
  31. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. Seventh Report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension* 2003;42:1206–52.
  32. World Health Organization/International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) Statement on Management of Hypertension. *J Hypertens* 2003;21:1983–92.
  33. Williams B, Poulter NR, Brown MJ, BHS guidelines working party, for the British Hypertension Society, et al. British Hypertension Society guidelines for hypertension management 2004 (BHS-IV): summary. *BMJ* 2004;328:634–40.

34. Keith NM, Wagener HP, Barker NW: Some different types of essential hypertension: their course and prognosis. *Am J Sci* 1939;197:332-43
35. Sharrett AR, Hubbard LD, Cooper, *et al.* Retinal arteriolar diameters and elevated blood pressure. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1999;150:263-70.
36. Hubbard L, Brothers RJ, King WL, *et al.* Methods for evaluation of retinal microvascular abnormalities associated with hypertension/sclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Ophthalmology* 1999;106:2269-80.
37. Wong TY, Klein R, Klein BEK, *et al.* Retinal microvascular abnormalities and their relations with hypertension, cardiovascular diseases and mortality. *Surv Ophthalmol* 2001;46:59-80.
38. Klein R, Klein BEK, Moss SE. The relation of systemic hypertension to changes in the retinal vasculature: the Beaver Dam Eye Study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1997;95:329-48.
39. Wang JJ, Mitchell P, Leung H, *et al.* Hypertensive retinal wall signs in a general older population: the Blue Mountains Eye Study. *Hypertension* 2003;42:534-41.
40. Wong TY, Klein R, Klein BE, *et al.* Retinal vessel diameters and their associations with age and blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4644-50.
41. Wong TY, Hubbard LD, Klein R, *et al.* Retinal microvascular abnormalities and blood pressure in older people: the Cardiovascular Health Study. *Br J Ophthalmol* 2002;86:1007-13.
42. Klein R, Sharrett AR, Klein BE, *et al.* Are retinal arteriolar abnormalities related to atherosclerosis? The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1644-50.
43. Pakter Hm, Ferlin E, Fuchs SC, Maestri MK, Moraes RS, Nunes G, Moreira LB, Gus M, Fuch FD. Measuring arteriolar-to-venous ratio in retinal photography of patients with hypertension: development and application of a new semi-automated method *Am J Hypertens*. 2005 Mar;18(3):417-21
44. Klein R, Klein BE, Moss SE, Wang Q: Hypertension and retinopathy, arteriolar narrowing, and arteriovenous nicking in a population. *Arch Ophthalmol* 1994;112:92-98.
45. Wong TY, Hubbard LD, Klein R, Marino EK, Kronmal R, Sharrett AR, Siscovick DS, Burke G, Tielsch JM: Retinal microvascular abnormalities and blood pressure in older people: The Cardiovascular Health Study. *Br J* 2002;86:1007-1013.

46. Wong TY, Klein R, Sharret AR, Duncan BB, Couper DJ, Klein BEK, Hubbard LD, Nieto FJ. Retinal arteriolar diameter and risk for hypertension. *Ann Intern Med* 2004, 140:248-255
47. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, *et al.* Retinal arteriolar narrowing and risk of coronary heart disease in men and women: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA* 2002;287:1153–9.
48. Duncan BB, Wong TY, Tyroler HÁ, Davis CE, Fuchs FD: Hypertensive retinopathy and incident coronary heart disease in high risk men. *Br J Ophthalmol* 2002;86:1002-1006
49. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, *et al.* Retinal arteriolar narrowing and risk of diabetes in middle-aged persons. *JAMA* 2002;287:2528–53.
50. Wong TY, Klein R, Nieto FJ, *et al.* Retinal microvascular abnormalities and ten-year cardiovascular mortality. A population-based case–control study. *Ophthalmology* 2003;110:933–40.
51. Johannesson M, Le Lorier J. How to assess the economics of hypertension control programmes. *J Hum Hypertens* 1996;10(Suppl. 1):S93-S94.
52. Dimsdale JE, Newton RP, Joist T. Neuropsychological side effects of B-blockers. *Arch Intern Med.* 1989; 149:514-525.
53. Long TD, Kathol RG. Critical review of data supporting affective disorder caused by nonpsychotropic medication. *Ann Clin Psychiatry* 1993; 5: 259-70.
54. Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Nefrologia. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial 2002.
55. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz para uso da Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial. II Diretriz para uso da Monitorização Residencial da Pressão Arterial IV MAPA / II MAPA. São Paulo 2005.