

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**TADASHI ONO JÚNIOR**

**APLICAÇÃO DE ATR-FTIR EM LÁGRIMAS HUMANAS PARA DISCRIMINAÇÃO  
EM RETINOPATIA DIABÉTICA**

**UBERLÂNDIA**

**2023**

**TADASHI ONO JÚNIOR**

**APLICAÇÃO DE ATR-FTIR EM LÁGRIMAS HUMANAS PARA DISCRIMINAÇÃO  
EM RETINOPATIA DIABÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

O58a Ono Júnior, Tadashi, 1986-  
2023 Aplicação de ATR-FTIR em lágrimas humanas para discriminação em retinopatia diabética [recurso eletrônico] / Tadashi Ono Júnior. - 2023.

Orientador: Foued Salmen Espindola.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.5056>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Espindola, Foued Salmen, 1957-, (Orient.).  
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

---

CDU: 61

André Carlos Francisco  
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408

**TADASHI ONO JÚNIOR**

**APLICAÇÃO DE ATR-FTIR EM LÁGRIMAS HUMANAS PARA DISCRIMINAÇÃO  
EM RETINOPATIA DIABÉTICA**

**Presidente da banca (orientador):**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Uberlândia, dia mês ano

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola (sigla da instituição)

---

Nome – Titulação (sigla da instituição)

---

Nome – Titulação (sigla da instituição)

---

Nome – Titulação (sigla da instituição)



## ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 08/PPGCSAUDE				
Data:	27.02.2024	Hora de início:	08:15h	Hora de encerramento:	11:00h
Matrícula do Discente:	12112CSD012				
Nome do Discente:	Tadashi Ono Júnior				
Título do Trabalho:	APLICAÇÃO DE ATR-FTIR EM LÁGRIMAS HUMANAS PARA DISCRIMINAÇÃO EM RETINOPATIA DIABÉTICA				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS BIOATIVOS NANOESTRUTURADOS				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Microsoft Teams, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da

Saúde, assim composta: Professores Doutores: Karina Braga Gomes Borges (UFMG), Alexandre Rieger (UNISC) e Foued Salmen Espindola (UFU) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Foued Salmen Espindola, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a

exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/02/2024, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges, Usuário Externo**, em 27/02/2024, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Rieger, Usuário Externo**, em 27/02/2024, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5216246** e o código CRC **F4EFB091**.

*A meus pais, Tadashi e Matilde, por toda dedicação para com minha formação profissional. À minha esposa Vanessa, por ser meu alicerce nos momentos de dificuldade, despertando minha coragem para vencer os desafios emergentes.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela orientação ao longo da jornada, pelos conselhos e principalmente por saber nos renovar o ânimo quando nos sentimos sobrecarregados.

Aos colaboradores da pesquisa, Dr. Douglas Carvalho Caixeta e Prof. Dr. Robinson Sabino Silva, pelo esforço e conhecimento técnico aplicado.

Ao residente de oftalmologia, Renato Souza Mendes; que foi uma “mão” a mais durante o processo de coleta das amostras.

A todos os colegas do laboratório que ajudaram no meu desenvolvimento como pesquisador.

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.



*“Aqui está o princípio essencial da educação:  
ensinar detalhes é trazer confusão;  
estabelecer as relações entre as coisas é trazer conhecimento”.*

*-Maria Montessori*

## RESUMO

**Introdução:** O diabetes é atualmente um dos maiores desafios de saúde pública a nível mundial. Se prolongado, conduz a várias complicações microvasculares diabéticas, como a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia. É provável que múltiplos fatores estejam envolvidos na predisposição dos indivíduos diabéticos para estas complicações. A detecção ou diagnóstico precoce é essencial para o desenvolvimento de estratégias que reduzam os fatores de risco e as consequências geradas pelas complicações diabéticas. **Objetivo:** Neste estudo, aplicamos a espectroscopia ATR-FTIR combinada com a análise de aprendizagem de máquina em amostras de lágrimas de indivíduos com retinopatia diabética, a fim de os diferenciar dos diabéticos sem retinopatia e das pessoas sem diabetes. O objetivo deste estudo é testar lágrimas através de um método simples, rápido, econômico e não invasivo, que possa ser aplicado em locais remotos de prestação de cuidados em saúde, que seja capaz de identificar as pessoas com retinopatia diabética. **Materiais e métodos:** Nós avaliamos um total de 59 indivíduos, sendo 24 no grupo não diabéticos (ND), 17 no grupo diabéticos (D) e 18 no grupo retinopatia diabética (DR). As lágrimas foram coletadas utilizando técnica com tubo microcapilar e armazenadas em tubos laboratoriais sob congelamento de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após descongelamento, 2 microlitros foram depositados em aparelho de FTIR acoplado com ATR e secas por 8 minutos. Então a análise espectral de cada amostra foi executada. Foram aplicadas no estudo ferramentas de pré-processamento e de aprendizagem de máquina nos espectros lacrimais gerados pelo ATR-FTIR de ND, D e DR. **Resultados:** O melhor algoritmo para discriminar entre os grupos ND e DR foi o AdaBoost, com uma acurácia de 0.73, uma sensibilidade de 0.70 e uma especificidade de 0.76. Utilizando SHAP (Shapley Additive Explanations), identificamos que os números de onda  $1151\text{ cm}^{-1}$ ,  $1425\text{ cm}^{-1}$ ,  $993\text{ cm}^{-1}$ ,  $1755\text{ cm}^{-1}$ ,  $1287\text{ cm}^{-1}$ ,  $1725\text{ cm}^{-1}$ ,  $2970\text{ cm}^{-1}$ ,  $2989\text{ cm}^{-1}$ ,  $1129\text{ cm}^{-1}$  e  $1088\text{ cm}^{-1}$  foram os mais importantes na diferenciação entre os dois grupos acima referidos. Os principais componentes biomoleculares correspondentes são os carboidratos e os lipídios. No que se refere ao grupo D em comparação com o grupo DR, o melhor teste foi o das Redes Neurais Artificiais, que apresentou uma acurácia de 0.73, uma sensibilidade de 0.77 e uma especificidade de 0.70. Os números de onda mais importantes neste método foram  $1256\text{ cm}^{-1}$ ,  $1647\text{ cm}^{-1}$ ,  $2899\text{ cm}^{-1}$ ,  $1414\text{ cm}^{-1}$ ,  $2879\text{ cm}^{-1}$ ,  $1075\text{ cm}^{-1}$ ,  $1179\text{ cm}^{-1}$ ,  $929\text{ cm}^{-1}$ ,  $916\text{ cm}^{-1}$  e  $903\text{ cm}^{-1}$ . Os três componentes biomoleculares mais importantes são os ácidos nucleicos, as proteínas e os lipídeos. **Conclusão:** Os resultados obtidos através dos modelos de predição, utilizando espectroscopia ATR-FTIR aplicada em lágrimas humanas

associada a algoritmos de aprendizagem de máquina, apontam para possível a discriminação de sujeitos com retinopatia diabética daqueles diabéticos e dos não diabéticos.

**Palavras-chave:** espectroscopia; ATR-FTIR; lágrimas; retinopatia diabética; aprendizado de máquina.

## ABSTRACT

**Introduction:** Diabetes is currently one of the biggest public health challenges worldwide. Prolonged diabetes leads to various diabetic microvascular complications, such as retinopathy, nephropathy and neuropathy. It is likely that multiple factors are involved in predisposing diabetic individuals to these complications. Early detection or diagnosis is essential for developing strategies to reduce the risk factors and costs generated by diabetic complications. **Objective:** In this study, we applied ATR-FTIR spectroscopy combined with machine learning analysis to tear samples from individuals with diabetic retinopathy in order to differentiate them from diabetics without retinopathy and people without diabetes. The aim of this study is to test tears using a simple, fast, inexpensive and non-invasive method, which can be applied in a remote care setting, that is able to identify people with diabetic retinopathy. **Materials and methods:** We evaluated a total of 59 individuals, 24 in the non-diabetic group (ND), 17 in the diabetic group (D) and 18 in the diabetic retinopathy group (DR). Tears were collected using the microcapillary tube technique and stored in laboratory tubes under  $-80^{\circ}\text{C}$  freezing. After thawing, 2 microliters were applied to an FTIR apparatus coupled with ATR and dried for 8 minutes. Spectral analysis of each sample was then carried out. Pre-processing and machine learning tools were applied in the study on the tear spectra generated by the ND, D and DR ATR-FTIR. **Results:** The best algorithm for discriminating between the ND and DR groups was AdaBoost, with an accuracy of 0.73, a sensitivity of 0.70 and a specificity of 0.76. Using SHAP (Shapley Additive Explanations), we identified that the wavenumbers  $1151\text{ cm}^{-1}$ ,  $1425\text{ cm}^{-1}$ ,  $993\text{ cm}^{-1}$ ,  $1755\text{ cm}^{-1}$ ,  $1287\text{ cm}^{-1}$ ,  $1725\text{ cm}^{-1}$ ,  $2970\text{ cm}^{-1}$ ,  $2989\text{ cm}^{-1}$ ,  $1129\text{ cm}^{-1}$  and  $1088\text{ cm}^{-1}$  were the most important in differentiating between the two groups mentioned above. The main corresponding biomolecular components are carbohydrates and lipids. With regard to group D compared to group DR, the best test was Artificial Neural Networks, which showed an accuracy of 0.73, a sensitivity of 0.77 and a specificity of 0.70. The most important wavenumbers in this method were  $1256\text{ cm}^{-1}$ ,  $1647\text{ cm}^{-1}$ ,  $2899\text{ cm}^{-1}$ ,  $1414\text{ cm}^{-1}$ ,  $2879\text{ cm}^{-1}$ ,  $1075\text{ cm}^{-1}$ ,  $1179\text{ cm}^{-1}$ ,  $929\text{ cm}^{-1}$ ,  $916\text{ cm}^{-1}$  and  $903\text{ cm}^{-1}$ . The three most important biomolecular components are nucleic acids, proteins and lipids. **Conclusion:** The results obtained through prediction models, using ATR-FTIR spectroscopy applied to human tears associated with machine learning algorithms, point to the possible discrimination of subjects with diabetic retinopathy from those with diabetes and non-diabetics.

**Keywords:** spectroscopy; ATR-FTIR; tears; diabetic retinopathy; machine learning.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Hiperglicemia e a via do poliol – página 18

Figura 2 - Aumento da produção de precursores de AGE e suas consequências patológicas – página 19

Figura 3 - Aumento da produção de precursores de AGE e suas consequências patológicas – página 20

Figura 4 - A hiperglicemia e a via da hexosamina – página 21

Figura 5 – Metabólitos detectados em lágrimas pela IDA LC MS/MS Peak Mining – página 33

Figura 6 - Análise de ontologia genética de proteínas lacrimais humanas identificadas neste estudo com base na ferramenta DAVID – página 35

Figura 7 - Representação e composição do filme lacrimal humano – página 37

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Características demográficas da amostra populacional.....página 46
- Tabela 2 - Algoritmos de aprendizagem de máquina aplicados em espectros de lágrimas para discriminar a retinopatia diabética (DR) de indivíduos não diabéticos (ND) e de diabéticos sem retinopatia (D).....página 48
- Tabela 3 - Modos vibracionais e componentes biomoleculares dos números de onda espectrais mais importantes pelo modelo AdaBoost e Redes Neurais Artificiais em discriminação de pacientes com retinopatia diabética.....página 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGE - Produtos de glicação avançada
- ATR - Reflexão total atenuada
- D - Diabéticos
- DM - Diabetes melitus
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DR - Retinopatia diabética
- ETDRS – Estudo de tratamento precoce da retinopatia diabética
- eNOS – enzima óxido nítrico sintase endotelial
- FADH<sub>2</sub> – Dinucleotídeo de flavina e adenina
- FTIR - Espectroscopia por transformada de Fourier
- GFAT - Glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase
- HbA1C% - Hemoglobina glicosilada
- IDF - Federação Internacional de Diabetes
- MnSOD – Superóxido desmutase de manganês
- MODY - Diabetes de início na maturidade da juventude
- NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo com hidrogênio
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
- ND - Não diabéticos
- NFB – Fator nuclear B
- NO – Óxido nítrico
- OCT – Tomografia de coerência óptica
- PKC - Proteína quinase C
- PDGF  $\beta$  - Fator de crescimento derivado de plaquetas beta
- PDGFR  $\beta$  – Receptor para o fator de crescimento derivado de plaquetas beta
- ROS - Espécimes reativos de oxigênio
- SHAP - Explicações aditivas de Shapley
- TCA - Ácido tricarboxílico
- UDP – Uridina difosfato
- VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular
- ZO-1 – Zônula ocludens 1
- WESDR – Estudo de Wiscosin em epidemiologia na retinopatia diabética

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>15</b>
2.1 DIABETES MELITUS.....	15
<b>2.1.1 Fisiopatologia das complicações microvasculares do diabetes .....</b>	<b>18</b>
2.1.1.1 Aumento do fluxo através da via do poliols.....	18
2.1.1.2 Produção intracelular de precursores de produtos de glicação avançada (AGE).....	19
2.1.1.3 Ativação da proteína quinase C (PKC).....	20
2.1.1.4 Aumento da atividade da via da hexosamina.....	20
2.1.1.5 O mecanismo unificador das vias acima citadas .....	21
2.2 A RETINOPATIA DIABÉTICA.....	23
<b>2.2.1 Fisiopatologia da retinopatia diabética.....</b>	<b>24</b>
2.2.1.1 A perda de pericitos .....	24
2.2.1.2 O espessamento das membranas basais capilares.....	25
2.2.1.3 Microaneurismas .....	26
2.2.1.4 Acelularidade capilar .....	27
2.2.1.5 A quebra da barreira hemato-retiniana.....	27
<b>2.2.2 Classificação da retinopatia diabética .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.3 Epidemiologia da retinopatia diabética .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.4 Triagem para retinopatia diabética.....</b>	<b>30</b>
2.3 AS LÁGRIMAS .....	32
<b>2.3.1 Uso das lágrimas como fluido diagnóstico.....</b>	<b>37</b>
2.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	38
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>42</b>
<b>4 CÓPIA DO ARTIGO: .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A retinopatia diabética, uma complicação microvascular específica do diabetes melitus, continua a ser a principal causa de perda de visão adquirida em todo o mundo em pessoas de meia-idade e, portanto, economicamente ativas (Yau *et al.*, 2012). Com o aumento do número de pessoas com diabetes, estima-se que a incidência de retinopatia diabética e das sequelas causadas pelas formas graves de retinopatia, aumentem consideravelmente nos próximos anos (Ting; Cheung; Wong, 2016).

Existe um conhecimento generalizado de que o rastreio, a detecção precoce e o tratamento imediato das complicações da retinopatia diabética que ameaçam a visão; permitem a prevenção da deficiência visual relacionada com a diabetes. Ensaio clínicos randomizados controlados demonstram que o tratamento precoce pode reduzir o risco de perda visual grave de um indivíduo (Ting; Cheung; Wong, 2016).

Hoje, o rastreio da retinopatia diabética é feito de várias formas por diferentes profissionais de saúde, tais como oftalmologistas, médicos de clínica geral e técnicos em optometria, utilizando oftalmoscopia direta ou indireta, biomicroscopia com lâmpada de fenda com uma lente portátil (90 ou 78 dioptrias), fotografia retiniana midriática ou não midriática, rastreio tele-retiniano (Wong *et al.*, 2018).

A reflectância total atenuada com espectroscopia por infravermelho pela transformada de Fourier (ATR-FTIR) destaca-se como uma técnica de espectroscopia vibracional possuindo utilização generalizada em ciências. Pode ser utilizada para sondar opticamente as alterações moleculares em amostras alvo. O método é utilizado para avaliar características de tecidos, células ou fluidos, permitindo uma atribuição precisa de grupos funcionais, tipos de ligação e conformações moleculares da amostra (Talari *et al.*, 2017).

O filme lacrimal tem múltiplas funções, mantendo uma superfície opticamente uniforme, lubrificando os tecidos oculares e protegendo contra infecções. A produção, secreção e eliminação eficientes do filme lacrimal são vitais para a saúde da superfície ocular (Kaštelan *et al.*, 2024). Qualquer disfunção de um componente do olho leva a alterações bioquímicas do filme lacrimal para uma ampla gama de patologias oculares. As lágrimas são uma solução complexa composta por água, enzimas, proteínas, imunoglobulinas e lipídios (Travo *et al.*, 2014). Métodos de análise como eletroforese, cromatografia e espectroscopia de massa ou técnicas proteômicas tem sido usados para detectar alterações biomoleculares e bioquímicas de lágrimas que estão relacionadas a patologias oculares (Travo *et al.*, 2014). De acesso não

invasivo e coleta relativamente descomplicada, pode trazer informações sobre os estados de equilíbrio tecidual (Amorim *et al.*, 2022).

Técnicas de análises não invasivas, rápidas, não dependentes de reagentes e de fácil execução, são extremamente importantes; principalmente possibilitando a aplicação em locais remotos e com pouca estrutura e acesso à serviços de saúde. Permitindo mais rapidez e eficácia na identificação de possíveis doentes que necessitam de maior atenção ou priorização no tratamento (Caixeta *et al.*, 2023).

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste tópico, será discorrido sobre o diabetes, os mecanismos bioquímicos de lesão microvascular no diabetes, a retinopatia diabética, as lágrimas como um fluido diagnóstico e a espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier.

### 2.1 DIABETES MELITUS

O diabetes mellitus, ou mais comumente chamado somente de diabetes, é uma doença crônica, na qual o indivíduo tem o aumento dos níveis de glicose no sangue, em decorrência de uma produção insuficiente do hormônio insulina, ou de um não aproveitamento adequado da insulina pelo corpo (Magliano; Boyko, 2021).

A insulina é um hormônio peptídico endócrino que se liga aos receptores ligados à membrana plasmática nas células-alvo para orquestrar uma resposta anabólica integrada à disponibilidade de nutrientes (Petersen; Shulman, 2018).

Embora muitos tipos de células somáticas expressem receptores de insulina, o papel da insulina na homeostase da glicose é tipificado pelos efeitos diretos da insulina no músculo esquelético, no fígado e nos adipócitos brancos. Esses tecidos desempenham papéis distintos na homeostase metabólica, necessitando de vias de transdução de sinal de insulina específicas do tecido (Petersen; Shulman, 2018).

Por exemplo, no músculo esquelético, a insulina promove a utilização e o armazenamento de glicose, aumentando o transporte de glicose e a síntese de glicogênio. No fígado, a insulina ativa a síntese de glicogênio, aumenta a expressão gênica lipogênica e diminui a expressão gênica de gliconeogênese. No tecido adipocitário branco (WAT), a insulina suprime a lipólise e aumenta o transporte de glicose e a lipogênese. Apesar destes diversos efeitos, os componentes proximais envolvidos na transdução do sinal da insulina são notavelmente semelhantes em todas as células responsivas à insulina. A diversidade das respostas fisiológicas à insulina em diferentes tipos de células deve-se em grande parte a efetores distais distintos. (Petersen; Shulman, 2018).

Além desses efeitos diretos, a insulina também exerce importantes efeitos indiretos nos tecidos-alvo. Devido à natureza integrada e específica do contexto destes efeitos indiretos, eles são difíceis de modelar em células cultivadas e são, conseqüentemente, menos bem compreendidos do que os efeitos diretos e autônomos da insulina. Um exemplo de ação indireta da insulina é o efeito da supressão da insulina na lipólise do TAB para diminuir o conteúdo

hepático de acetil-CoA, por sua vez diminuindo alostericamente a atividade da piruvato carboxilase. Este mecanismo, juntamente com a supressão da renovação do glicerol, permite a supressão da lipólise do TAG pela insulina para suprimir a gliconeogênese hepática. Supressão insulínica da secreção de glucagon através de sinalização parácrina na ilhota pancreática e insulina no sistema nervoso central (SNC) representam outras vias importantes de ação indireta da insulina (Petersen; Shulman, 2018)

Quando são necessários níveis mais elevados de insulina circulante para alcançar a resposta integrada de redução da glicose descrita acima, um indivíduo é considerado resistente à insulina. Uma variedade de entidades clínicas – pré-diabetes, lipodistrofia, síndrome do ovário policístico, doença hepática gordurosa não alcoólica – são acompanhadas por concentrações aumentadas de insulina plasmática em jejum. Este aumento da carga de trabalho para o pâncreas endócrino, e consequente descompensação de células, é um mecanismo importante para o desenvolvimento de diabetes melitus tipo 2 (DM2) evidente (Petersen; Shulman, 2018).

O diabetes tipo 1 (DM1) é um distúrbio autoimune complexo com múltiplos fatores implicados em sua fisiopatologia. Como outras doenças autoimunes, seu desenvolvimento envolve influências genéticas, imunológicas e ambientais. O desenvolvimento do diabetes tipo 1 envolve a interação entre o sistema imunológico (esquerda) e as células  $\beta$  pancreáticas (direita). A maioria dos casos de diabetes tipo 1 provavelmente envolve alterações sutis na função imunológica; por exemplo, alterações mediadas por genes em loci associados à regulação de células T (HLA, CTLA4, PTPN2, PTPN22 e IL2RA), juntamente com alterações na biologia das células  $\beta$  que são genéticas ou ambientais. Fatores ambientais podem desencadear o estresse das células  $\beta$  e promover a geração de neoantígenos. A infecção pode influenciar as células  $\beta$ , provocando inflamação e promovendo a autoimunidade através do mimetismo molecular, em que as células T ativadas em resposta a um antígeno microbiano também reagem com um autoantígeno (Quattrin; Mastrandrea; Walker, 2023).

O diabetes pode ser classificado em: tipo 1, por destruição imune das células beta pancreáticas, resultando em deficiência absoluta de insulina; tipo 2, devido à resistência insulínica; diabetes gestacional que é diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gestação em pessoa previamente sem diagnóstico de diabetes; outros tipos específicos: síndromes de diabetes monogênico (como diabetes neonatal e diabetes com início em jovens mais maduros [do inglês MODY]), doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite) e diabetes induzido por drogas ou produtos químicos (como com o uso de glicocorticoides, no tratamento de HIV/AIDS ou após transplante de órgãos) (American Diabetes Association, 2017).

A prevalência do diabetes, em 2021, nos adultos de 20 – 79 anos, foi estimada em 536 milhões de pessoas no mundo (10,5 % da população). Há uma expectativa, para 2045, de um aumento de 16% devido ao envelhecimento da população. 95% deste aumento deve ser nos países de baixa e média rendas. A incidência do diabetes, parece estar estável ou diminuindo nos países de alta renda. Estes números podem sugerir que são pela razão de estratégias de prevenção da doença e/ou a mudança nos padrões de rastreamento e diagnóstico, como por exemplo a utilização da dosagem da HbA1C (International Diabetes Federation, 2021).

O fardo do sofrimento devido à diabetes, está a aumentando, apesar do investimento significativo em cuidados clínicos e na investigação farmacêutica. Este aumento excede o crescimento e o envelhecimento da população. Notavelmente, a Europa Ocidental tem uma taxa de aumento superior à das médias globais e asiáticas. Mesmo com os elevados níveis de despesas clínicas e de saúde pública, esta região apresenta tendência de aumento dos índices de diabetes em suas populações. Uma explicação pode ser fatores de risco não modificáveis, como idade e histórico familiar. No entanto, fatores como uma dieta ocidental altamente processada e rica em calorias e um estilo de vida sedentário também podem estar contribuindo (Khan *et al.*, 2019).

A diabetes representa um fardo substancial para a sociedade sob a forma de custos médicos diretos mais elevados, perda de produtividade, mortalidade prematura e custos intangíveis sob a forma de redução da conectividade social e da qualidade de vida. O fardo econômico estimado da diabetes em 2017 foi de 327 mil milhões de dólares em 2017, incluindo 237 mil milhões de dólares em custos médicos diretos e 90 mil milhões de dólares em produtividade reduzida (Parker *et al.*, 2024).

A hiperglicemia tem papel crítico no desenvolvimento das complicações microvasculares, como demonstrado pelos estudos pivotais DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) (Jorgensen, 1987) e UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) (Stratton, 2000). Algumas células como as do endotélio vascular, glomérulos e neurônios; não conseguem regular para baixo a concentração de intracelular de glicose, sendo o estado de hiperglicemia prejudicial ao metabolismo das mesmas, resultando em dano microvascular (Ryan, 2013).

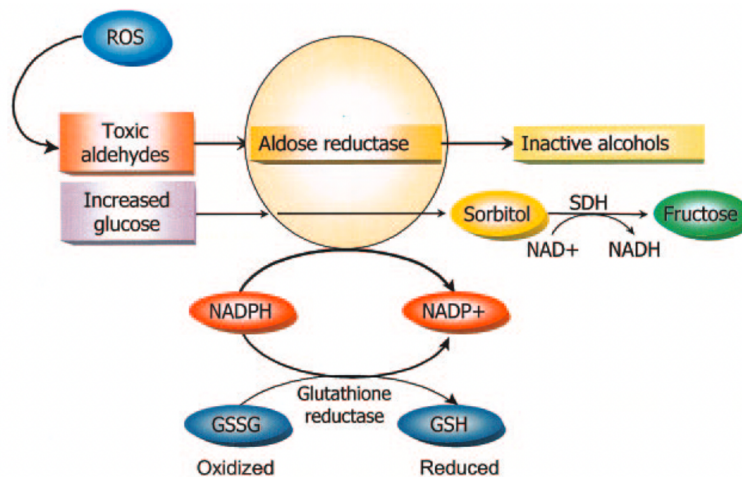
A retinopatia diabética é uma das complicações microvasculares do diabetes, que tem em sua origem a hiperglicemia. Porém, as vias metabólicas deste processo patológico ainda não são completamente conhecidas. Algumas teorias são postuladas e serão brevemente descritas a seguir (Brownlee, 2005).

## 2.1.1 Fisiopatologia das complicações microvasculares do diabetes

### 2.1.1.1 Aumento do fluxo através da via do polioliol

A via do polioliol centra-se na enzima aldose redutase. A aldose redutase tem normalmente a função de reduzir os aldeídos tóxicos na célula a álcoois inativos, mas quando a concentração de glicose na célula se torna demasiado elevada, a aldose redutase também reduz essa glicose a sorbitol, que é posteriormente oxidado a frutose. No processo de redução da glicose intracelular elevada a sorbitol, a aldose redutase consome o cofator NADPH. Mas, o NADPH é também o cofator essencial para a regeneração de um antioxidante intracelular crítico, a glutathiona reduzida. Ao reduzir a quantidade de glutathiona reduzida, a via do polioliol aumenta a suscetibilidade ao estresse oxidativo intracelular. Através de estudos em que cães diabéticos que foram tratados durante 5 anos com um estimulador da aldose redutase, a velocidade de condução nervosa nos cães diabéticos diminuiu ao longo do tempo, tal como acontece nos doentes. Em contrapartida, nos cães diabéticos tratados com um inibidor da aldose redutase, o defeito induzido pela diabetes na velocidade de condução nervosa foi evitado (Brownlee, 2005).

Figura 1 – Hiperglicemia e a via do polioliol



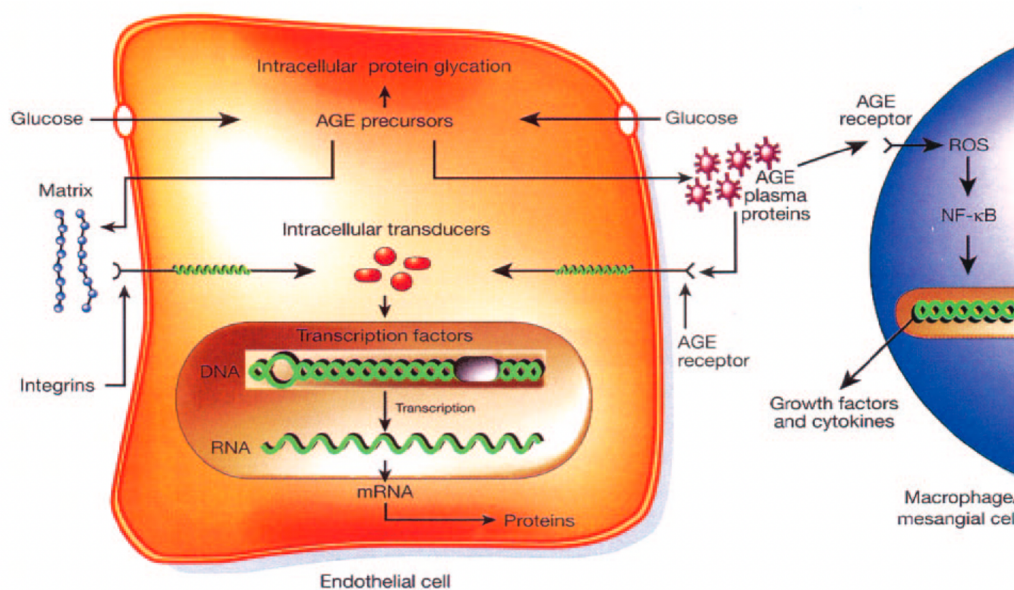
Fonte: (Brownlee, 2005)

### 2.1.1.2 Produção intracelular de precursores de produtos de glicação avançada (AGE)

Estes são um conjunto de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, que passam por um processo irreversível de modificação de sua estrutura bioquímica por redução de carboidratos ou de derivados de carboidratos. Tais produtos, parecem danificar as células através de três mecanismos. O primeiro mecanismo, é a modificação de proteínas intracelulares, incluindo, mais importante, proteínas envolvidas na regulação da transcrição de genes. O segundo mecanismo, é que esses precursores de AGE podem se difundir para fora da célula e modificar moléculas da matriz extracelular nas proximidades, o que altera a sinalização entre a matriz e a célula e causa disfunção celular. O terceiro mecanismo, é que esses precursores de AGE se difundem para fora da célula e modificam as proteínas circulantes no sangue, como a albumina, num processo de glicação (Brownlee, 2005).

Estas proteínas circulantes modificadas podem então ligar-se aos receptores de AGE e ativá-los, provocando assim a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que, por sua vez, causam patologia vascular. Pode-se comprovar tal teoria, através de muitos estudos em animais, que mostram que a inibição farmacológica dos AGE previne as alterações estruturais tardias da retinopatia diabética experimental (Brownlee, 2005).

Figura 2- Aumento da produção de precursores de AGE e suas consequências patológicas.

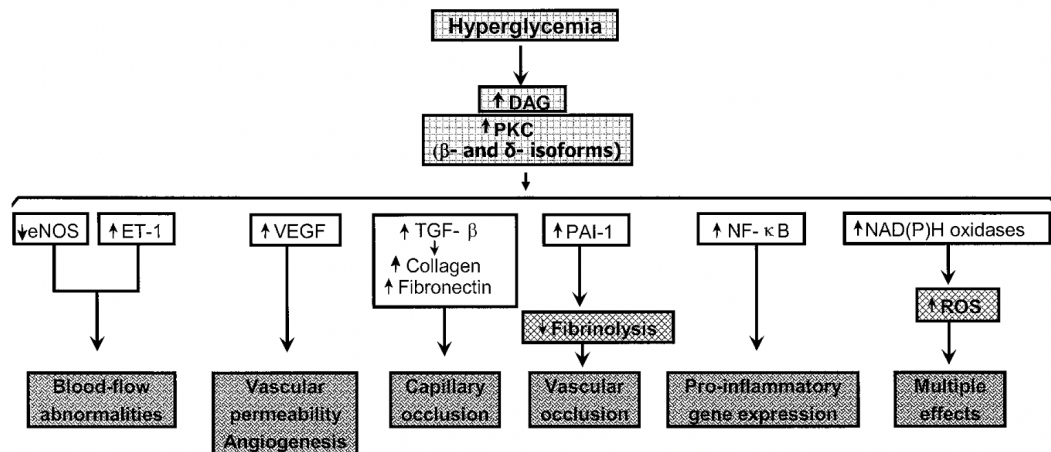


Fonte: (Brownlee, 2005)

### 2.1.1.3 Ativação da proteína quinase C (PKC)

Nesta via, a hiperglicemia no interior da célula aumenta a síntese de uma molécula chamada diacilglicerol (DAG), que é um cofator de ativação essencial para as isoformas clássicas da proteína quinase. Quando a PKC é ativada por hiperglicemia intracelular, tem uma variedade de efeitos na expressão genética. Por exemplo, o vasodilatador que produz óxido nítrico endotelial (NO) sintase (eNOS) está diminuído, enquanto o vasoconstritor endotelina-1 (ET-1) está aumentado. O fator de crescimento transformador beta (TGF-beta) e o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) também estão aumentados. Isto leva a anormalidades de fluxo vascular, oclusões capilares e expressão de genes pró inflamatórios. Sabemos que esta via metabólica é importante devido a muitos estudos em animais, que demonstram que a inibição da PKC previne alterações precoces na retina e nos rins dos diabéticos (Brownlee, 2005).

Figura 3 - Consequências da ativação da PKC induzida pela hiperglicemia.



Fonte: (Brownlee, 2005)

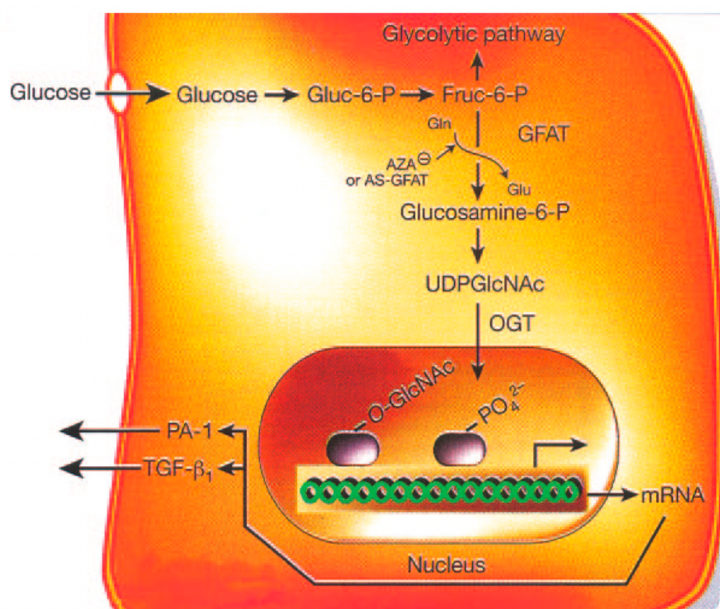
### 2.1.1.4 Aumento da atividade da via da hexosamina

Quando a glicose é elevada no interior de uma célula, a maior parte dessa glicose é metabolizada através da glicólise, passando primeiro para glicose-6-fosfato, depois para frutose-6-fosfato e, em seguida, para o resto da via glicolítica. No entanto, parte dessa frutose-6-fosfato é desviada para uma via de sinalização na qual uma enzima chamada GFAT (glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase) converte a frutose-6-fosfato em glucosamina-6-fosfato e, finalmente, em UDP (uridina difosfato) N-acetil glucosamina. O que acontece depois disso é que a N-acetil glucosamina é colocada em resíduos de serina e treonina de fatores de



transcrição, tal como no processo de fosforilação, e a modificação excessiva desta glucosamina resulta frequentemente em alterações patológicas da expressão genética. O aumento da modificação do fator de transcrição Sp1 (proteína específica-1) resulta num aumento da expressão do fator de crescimento transformador-1 e do inibidor do ativador do plasminogénio-1, ambos prejudiciais para os vasos sanguíneos diabéticos. Este mecanismo demonstrou que desempenha um papel tanto nas anomalias induzidas pela hiperglicemia na expressão genética das células glomerulares como na disfunção dos cardiomiócitos induzida pela hiperglicemia em cultura celular. Nas placas da artéria carótida de indivíduos diabéticos de tipo 2, a modificação das proteínas das células endoteliais pela via da hexosamina está também significativamente aumentada (Brownlee, 2005).

Figura 4 - A hiperglicemia e a via da hexosamina.



Fonte: (Brownlee, 2005)

#### 2.1.1.5 O mecanismo unificador das vias acima citadas

Uma característica diferenciadora consistente, comum a todos os tipos de células danificadas pela hiperglicemia, é um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Embora a hiperglicemia tenha sido associada ao estresse oxidativo no início dos anos 60, não se conhecia o mecanismo subjacente que o produzia nem as suas consequências para as vias de lesão hiperglicêmica (Brownlee, 2005).

A hiperglicemia aumenta a produção de superóxido pelas mitocôndrias: existem quatro complexos proteicos na cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, denominados complexos I, II, III e IV. Quando a glicose é metabolizada através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), gera doadores de elétrons. O principal doador de elétrons é o NADH, que doa elétrons ao complexo I. O outro doador de elétrons gerado pelo ciclo TCA é o FADH<sub>2</sub>, formado pela succinato desidrogenase, que doa elétrons ao complexo II. Os elétrons destes dois complexos passam para a coenzima Q e, a partir desta, são transferidos para o complexo III, para o citocromo C, para o complexo IV e, finalmente, para o oxigênio molecular, que reduzem a água. O sistema de transporte de elétrons está organizado desta forma para que o nível de ATP possa ser regulado com precisão. À medida que os elétrons são transportados, parte da energia desses elétrons é utilizada para bombear prótons através da membrana nos complexos I, III e IV. Isto gera o que é, de fato, uma tensão através da membrana mitocondrial. A energia deste gradiente de voltagem impulsiona a síntese de ATP pela ATP sintase (Brownlee, 2005).

Alternativamente, as proteínas desacopladoras (UCPs) podem depletar o gradiente de voltagem para gerar calor como forma de manter constante a taxa de geração de ATP. É isso que acontece nas células normais. Em contraste, nas células diabéticas com glicose elevada no seu interior, há mais glicose a ser oxidada no ciclo TCA, o que, com efeito, empurra mais doadores de elétrons (NADH e FADH<sub>2</sub>) para a cadeia de transporte de elétron. Como resultado, o gradiente de tensão através da membrana mitocondrial aumenta até ser atingido um limiar crítico. Neste ponto, a transferência de elétrons dentro do complexo III é bloqueada, fazendo com que eles voltem para a coenzima Q, que doa os elétrons, um de cada vez, ao oxigênio molecular, gerando assim superóxido. A isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase degrada este radical livre de oxigênio em peróxido de hidrogênio, que é depois convertido em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> por outras enzimas. Ao observar estas células com um corante que muda de cor com o aumento da voltagem da membrana mitocondrial, descobriu-se que a hiperglicemia intracelular aumentava de fato a voltagem através da membrana mitocondrial acima do limiar crítico necessário para aumentar a formação de superóxido (Brownlee, 2005).

Para provar que a cadeia de transporte de elétrons produz efetivamente superóxido pelo mecanismo que proposto, foi examinado o efeito da superexpressão da UCP-1 ou da superóxido dismutase de manganês (MnSOD) na produção de ROS induzida pela hiperglicemia. A hiperglicemia provocou um grande aumento da produção de ROS. Em contraste, um nível idêntico de hiperglicemia não aumenta as ROS quando também foi colapsado o gradiente de voltagem mitocondrial através da sobre expressão de UCP. Do mesmo modo, a hiperglicemia

não aumenta as ROS quando foi degradado o superóxido através da sobre expressão da enzima MnSOD (Brownlee, 2005).

Estes dados demonstram duas coisas. Em primeiro lugar, o efeito UCP mostra que a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é a fonte do superóxido induzido pela hiperglicemia. Em segundo lugar, o efeito da MnSOD mostra que o ROS inicial formado é de fato o superóxido. Para confirmar estes resultados através de uma abordagem experimental independente, foi retirado o DNA mitocondrial das células endoteliais normais para formar as chamadas células endoteliais 0, que não possuem uma cadeia de transporte de elétrons mitocondrial funcional. Quando a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é removida, o efeito da hiperglicemia na produção de ROS é completamente perdido. Do mesmo modo, nas células endoteliais, a hiperglicemia não consegue ativar completamente a via do poli-ol, a formação de AGE, a PKC ou a via da hexosamina. Também foi analisado o efeito da sobre expressão de UCP-1 ou da sobre expressão de MnSOD em cada uma destas quatro vias ativadas pela hiperglicemia. A hiperglicemia não ativou nenhuma das vias quando o gradiente de tensão através da membrana mitocondrial foi colapsado pela UCP-1 ou quando o superóxido produzido foi degradado pela MnSOD. Foram verificadas todas estas experiências de cultura de células endoteliais em ratinhos transgênicos que sobre expressam a MnSOD. Quando os animais de tipo selvagem são tornados diabéticos, todas as quatro vias são ativadas nos tecidos onde ocorrem as complicações diabéticas (Brownlee, 2005).

Em contrapartida, quando os ratinhos transgênicos com MnSOD são tornados diabéticos, não há ativação de nenhuma das quatro vias. Nas células endoteliais, a PKC também ativa o fator nuclear B (NFB), um fator de transcrição que, por sua vez, ativa muitos genes pró-inflamatórios na vasculatura. Como esperado, a ativação da PKC induzida pela hiperglicemia é impedida pela UCP-1 ou pela MnSOD, tanto em células como em animais. É importante notar que a inibição da sobre produção de superóxido induzida pela hiperglicemia através de uma abordagem transgênica (superóxido dismutase [SOD]) também previne a nefropatia diabética experimental a longo prazo no melhor modelo animal desta complicação: o rato diabético db/db (Brownlee, 2005).

## 2.2 A RETINOPATIA DIABÉTICA

A retinopatia diabética é a complicação microvascular mais comum do diabetes e possui as seguintes alterações anatômicas:

## 2.2.1 Fisiopatologia da retinopatia diabética

### 2.2.1.1 A perda de pericitos

É um dos sinais mais precoces e específicos da retinopatia diabética. Este achado foi descrito pela primeira vez por pesquisadores após examinarem montagens planas de vasculatura retiniana digerida com tripsina de indivíduos humanos diabéticos (Cogan, 1961) (Kuwabara, 1960). Desde o seu relatório inicial, os seus achados foram confirmados por vários investigadores. Nos seres humanos e nos caninos, a digestão com tripsina de montagens planas da vasculatura da retina revela a perda de pericitos, evidenciada pelo desenvolvimento de pericitos fantasmas, espaços aneurismáticos vazios que sobressaem das paredes capilares e que não possuem o núcleo de coloração escura de um pericito viável (Ryan, 2013).

Os pericitos são normalmente identificáveis nestes espaços pelos seus núcleos que se coram de forma escura e estão espaçados regularmente ao longo da parede capilar, produzindo a aparência de "saliências num tronco". Os pericitos são células contrácteis que desempenham um papel importante na autorregulação microvascular (Ryan, 2013).

A perda de pericitos leva a alterações das junções intercelulares vasculares e ao comprometimento da barreira interna sangue-retina. Estes efeitos resultam na dilatação venosa e na formação de grânulos que são visíveis clinicamente. A perda de junções intercelulares também parece promover a proliferação de células endoteliais, resultando no desenvolvimento de microaneurisma. A perda de pericitos parece ser especialmente significativa no desenvolvimento da retinopatia diabética, embora também tenha sido reportado na neuropatia diabética levando à isquemia neuronal (Ryan, 2013).

O mecanismo pelo qual a hiperglicemia leva à degenerescência dos pericitos permanece em grande parte desconhecido. As duas principais hipóteses implicam a via da aldose redutase e o fator de crescimento derivado das plaquetas-beta (PDGF- $\beta$ ). Alguns autores relataram a localização da enzima aldose redutase nos pericitos capilares da retina, mas não nas células endoteliais em amostras humanas, utilizando técnicas de imuno-histoquímica (Akagi *et al.*, 1983).

Estes resultados seriam consistentes com a perda específica de pericitos capilares observada na retinopatia diabética e noutras complicações microvasculares da diabetes. Dois outros grupos, no entanto, não conseguiram identificar a presença de aldose redutase em capilares da retina de roedores e caninos utilizando técnicas de imuno-histoquímica. Além

disso, um terceiro grupo relatou a presença de atividade de aldose redutase em pericitos capilares da retina bovina em cultura, bem como em células endoteliais capilares da retina (Ryan, 2013).

Estes relatórios contraditórios resultam provavelmente de diferenças específicas entre espécies na expressão da aldose redutase e sublinham a necessidade de ter cuidado ao interpretar modelos animais de doença. Verificou-se que o PDGF- $\beta$  é fundamental para o recrutamento de pericitos na vasculatura de vários tecidos e órgãos. Está bem documentado que as células endoteliais expressam PDGF- $\beta$ ,18-21 e sabe-se que os pericitos *in vitro* expressam receptores de PDGF- $\beta$  e respondem ao PDGF- $\beta$ . Pesquisadores referiram que, no modelo de ratinho deficiente em PDGF- $\beta$ , os pericitos não se desenvolvem nos capilares em desenvolvimento durante a angiogênese (Lindahl *et al.*, 1997). Estudos subsequentes utilizando ratinhos deficientes em PDGF- $\beta$  e em PDGF receptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) revelaram que, embora possa ocorrer uma indução independente de PDGF- $\beta$ /PDGFR- $\beta$  dos precursores de pericitos, a expansão dos pericitos depende de uma via de sinalização parácrina PDGF- $\beta$ /PDGFR- $\beta$  intacta (Ryan, 2013).

A ablação do PDGF- $\beta$  ou do PDGFR- $\beta$  conduziu a fenótipos idênticos nestes ratinhos. Estes estudos sugerem que o PDGF- $\beta$  derivado das células endoteliais promove a co-migração de pericitos que expressam PDGFR- $\beta$  ao longo dos novos vasos em crescimento, e a interrupção da via PDGF- $\beta$ /PDGFR- $\beta$  resulta na deficiência observada de pericitos nos capilares. Uma vez que se verificou que o PDGF- $\beta$  é fundamental para o recrutamento de pericitos durante a angiogênese, foi sugerido que o PDGF- $\beta$  pode desempenhar um papel importante na manutenção da viabilidade dos pericitos na vasculatura madura, embora não existam estudos que confirmem esta hipótese (Ryan, 2013).

#### 2.2.1.2 O espessamento das membranas basais capilares

É uma lesão bem documentada da retinopatia diabética, visível à microscopia eletrônica. Outros achados de microscopia eletrônica incluem a deposição de colágeno fibrilar e a vacuolização em "queijo suíço" do padrão homogêneo de colágeno da membrana basal (Ryan, 2013).

O mecanismo bioquímico que leva ao espessamento da membrana basal permanece desconhecido, mas os estudos sugerem um papel para a aldose redutase e a via do sorbitol. Os ratos não diabéticos alimentados com uma dieta rica em galactose durante períodos prolongados de tempo desenvolvem espessamento da membrana basal capilar da retina, deposição de

colágeno fibrilar e vacuolização em queijo suíço. Por outro lado, os ratos alimentados com uma dieta de controle ou com uma dieta rica em galactose juntamente com o inibidor da aldose redutase sorbinil não desenvolvem espessamento da membrana basal. No entanto, a observação de que o espessamento da membrana basal dos glomérulos renais em ratos diabéticos e galactosêmicos não é inibido pelos inibidores da aldose redutase lança dúvidas de que a via da aldose redutase seja a principal e sugere que o espessamento da membrana basal possa ser uma resposta secundária não específica (Ryan, 2013).

A glicação do colágeno da membrana basal por processos enzimáticos e não enzimáticos pode ser outro mecanismo que desempenha um papel no espessamento da membrana basal. Além do colágeno tipo IV, o tipo predominante presente na membrana basal, estão também presentes outros tipos de colágeno e macromoléculas não colagênicas, como a laminina 34, a entactina, o proteoglicano de sulfato de heparano e fatores de crescimento ligados à membrana basal. Por exemplo, Shimomura/Spiro e Spiro/Spiro relataram uma diminuição do proteoglicano de sulfato de heparano em glomérulos renais de indivíduos humanos diabéticos (Shimomura; Spiro, 1987) (Spiro; Spiro, 1971). Estudos imunocitoquímicos de microscopia eletrônica quantitativa descobriram que o espessamento da membrana basal da retina e dos glomérulos renais em ratos galactosêmicos está associado a um aumento relativo dos níveis de colágeno tipo IV e laminina, enquanto os níveis relativos de proteoglicano de sulfato de heparano permanecem inalterados (Ryan, 2013).

### 2.2.1.3 Microaneurismas

Embora a perda de pericitos seja o sinal mais precoce da retinopatia diabética, só é observável histologicamente. O sinal clinicamente visível mais precoce da retinopatia diabética é o microaneurisma. Os microaneurismas aparecem como dilatações em forma de uva ou fusiformes dos capilares da retina à microscopia ótica. Podem ser hipercelulares ou acelulares (Ryan, 2013). Ao exame oftalmoscópico, os microaneurismas aparecem como pequenos pontos vermelhos intrarretinianos localizados na parte interna da retina. Na angiografia fluoresceínica, aparecem como pontos hiperfluorescentes pontuais com quantidades variáveis de fuga de fluoresceína. A morte de pericitos e a perda de contatos intercelulares vasculares podem levar à proliferação de células endoteliais e ao desenvolvimento de microaneurismas (Ryan, 2013).

Os pericitos parecem exercer um efeito antiproliferativo e a perda deles pode explicar o desenvolvimento de microaneurismas hipercelulares. No entanto, este mecanismo não explica os microaneurismas acelulares. Os microaneurismas acelulares podem desenvolver-se a partir

de microaneurismas hipercelulares que se tornam acelulares devido à apoptose das células endoteliais e dos pericitos. A perda de pericitos pode também resultar no enfraquecimento da parede capilar, promovendo o desenvolvimento de microaneurismas nos pontos fracos estruturais (Ryan, 2013).

Os pericitos contêm miofibrilhas com propriedades contráteis e podem atuar como células musculares lisas de vasos maiores, exercendo um tônus na parede do vaso para contrariar a pressão transmural. A perda do tônus dos pericitos pode resultar na dilatação focal da parede do vaso, levando ao desenvolvimento de um microaneurisma. No entanto, a pressão transmural do leito capilar é baixa em relação à circulação arterial e os microaneurismas capilares da retina podem desenvolver-se noutras doenças em que não se observa perda de pericitos (Ryan, 2013).

#### 2.2.1.4 Acelularidade capilar

A perda completa dos elementos celulares da rede capilar da retina pode ser vista como uma lesão microvascular mais avançada na retinopatia diabética e noutras retinopatias microvasculares. Em correlações clínico patológicas com angiografias fluoresceínicas realizadas pouco antes da enucleação do olho para fins terapêuticos ou porque o doente faleceu e o olho foi removido durante a autópsia, as digressões vasculares da retina do olho enucleado mostraram que os capilares acelulares não são funcionais, uma vez que apareceram como regiões de não perfusão na angiografia. Uma vez que a acelularidade capilar não é exclusiva da diabetes, uma variedade de mecanismos patogênicos pode resultar neste achado inespecífico (Ryan, 2013).

#### 2.2.1.5 A quebra da barreira hemato-retiniana

É uma importante característica fisiopatológica da retinopatia diabética que leva ao desenvolvimento de edema macular, a principal causa de perda de visão em pacientes diabéticos. Um dos mecanismos pelos quais a função desta barreira se altera envolve a abertura das junções apertadas entre os processos das células endoteliais vasculares (Ryan, 2013).

Estas junções oclusivas aparecem como uma estrutura pentalaminar na microscopia eletrônica, consistindo em duas camadas exteriores e uma camada central eletro-densa ensanduichando duas camadas eletro-lucentes, dando a aparência de duas membranas plasmáticas "fundidas" (Ryan, 2013).

Utilizando marcadores como o cloreto de lantânio ou a peroxidase de rábano, a microscopia eletrônica pode ser utilizada para demonstrar que estas moléculas não podem passar na presença de uma junção intacta. No entanto, quando as junções oclusivas estão abertas, tornam-se permeáveis a estas moléculas marcadoras. Várias proteínas importantes estão envolvidas na formação e função das junções oclusivas, sendo a ZO-1 (zonula occludens) e a ocludina as mais bem caracterizadas. Na presença de histamina, a expressão de ZO-1 nas células endoteliais da retina em cultura é reduzida de uma forma dependente da dose. A cultura em meio condicionado por astrócitos aumenta a expressão de ZO-1, enquanto a glicose elevada diminui a expressão de ZO-1 (Ryan, 2013).

Estes resultados *in vitro* também foram apoiados por estudos *in vivo*. Verificou-se uma redução da expressão e da distribuição anatômica da ocludina na diabetes experimental. Do mesmo modo, em ratos experimentalmente diabéticos e em humanos diabéticos, os anti-histamínicos reduzem a fuga de fluoresceína para o vítreo. Descobriu-se que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um mediador importante que leva à quebra da barreira interna sangue-retina (Ryan, 2013).

Antes da descoberta do seu papel bem documentado na promoção da neovascularização, verificou-se que o VEGF aumentava a permeabilidade dos vasos, o que levou ao seu nome alternativo de "fator de permeabilidade vascular". O mecanismo pelo qual o VEGF leva à quebra da barreira hemato-retiniana interna parece envolver a alteração das junções oclusivas das células endoteliais. A injeção intravítrea de VEGF em ratos aumentou a produção do radical livre óxido nítrico e levou à fosforilação de ZO-1. Outro fator importante que promove a permeabilidade vascular da retina envolve o sistema caliceína-cinina. Estudos proteômicos do vítreo de doentes com retinopatia diabética avançada identificaram componentes do sistema caliceína-cinina, incluindo a caliceína plasmática, o fator XII e o cininogénio. Da mesma forma, a inibição do sistema caliceína-cinina reduz o vazamento vascular da retina causado por diabetes e hipertensão (Ryan, 2013).

O mecanismo pelo qual o sistema caliceína-cinina promove a permeabilidade vascular provavelmente envolve a bradicinina. A bradicinina, através do óxido nítrico, induz o vasorrelaxamento das arteríolas da retina. A infusão intravenosa de bradicinina resulta na dilatação das arteríolas e vénulas da retina, um efeito que é reduzido pela indometacina e pelo inibidor seletivo da ciclo-oxigenase-2 nimesulida. A bradicinina é também um neuropeptídeo com um efeito direto sobre a glia e os neurónios, que podem libertar fatores vasoativos que afetam o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular (Ryan, 2013).



### 2.2.2 Classificação da retinopatia diabética

A escala de gravidade ETDRS (Estudo de Tratamento Precoce em Retinopatia Diabética) foi posteriormente simplificada na escala de gravidade International Clinical Diabetic Retinopathy (ICDR), para uma utilização clínica diária generalizada. A escala de gravidade ICDR resume essencialmente os 14 níveis de gravidade da escala de gravidade ETDRS em 5 níveis de gravidade da retinopatia. Devido à sua conveniência e facilidade de adoção, a escala de gravidade ICDR é, de longe, o sistema de classificação mais comum em uso clínico em todo o mundo. A escala de gravidade ICDR foi desenvolvida a partir dos dados e sistemas de classificação ETDRS e WESDR (Estudo epidemiológico em retinopatia diabética de Wiscosin), através de um seminário internacional de consenso em 2002. Uma reunião de planejamento inicial, que incluiu representantes de cinco países, foi realizada em conjunto com a Reunião Anual da Academia Americana de Oftalmologia (AAO) em 2001 (Yang *et al.*, 2022).

Posteriormente, em 2002, 14 indivíduos de 11 países participaram no Congresso Internacional de Oftalmologia em Sidney e desenvolveram o ICDR através de discussão e consenso através de um sistema Delphi modificado. Este sistema de classificação foi deliberadamente concebido para ser conveniente e fácil de utilizar na prática clínica quotidiana por oftalmologistas gerais e médicos de cuidados primários. A escala de gravidade ICDR, juntamente com os níveis correspondentes da escala de gravidade ETDRS, são apresentados da seguinte forma: **sem aparente retinopatia, retinopatia não proliferativa leve, retinopatia não proliferativa moderada, retinopatia não proliferativa grave, retinopatia proliferativa**. Várias diretrizes clínicas internacionais para a gestão da RD, tais como as do Conselho Internacional de Oftalmologia (ICO), utilizam a escala de gravidade ICDR para recomendações de gestão e intervalos de vigilância de seguimento da RD (Yang *et al.*, 2022).

### 2.2.3 Epidemiologia da retinopatia diabética

A retinopatia diabética ocorre em 30% a 40% de todos os indivíduos diabéticos, e o aumento na prevalência do diabetes é claramente paralelo ao da retinopatia. Uma meta-análise recente estimou que a atual prevalência global da RD é de cerca de 103 milhões de indivíduos, prevendo-se que aumente ainda mais para 161 milhões de indivíduos até 2045. Com base em projeções epidemiológicas recentes para 2030, as taxas de aumento da prevalência de RD em regiões de rendimento médio a baixo, como o Pacífico Ocidental, o Médio Oriente, o Norte de

África e a África, variam entre 20,6% e 47,2%, o que longe supera as taxas projetadas em regiões de alta renda, como Europa e América do Norte (Wong; Tan, 2023).

Um grande estudo epidemiológico sobre a retinopatia diabética foi Wiscosin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR); que foi desenvolvido de 1980 – 1982; e mostrou que 71%, 23% e 11% das pessoas com diabetes tipo 1 e 47%, 6% e 8% das pessoas com diabetes tipo 2 apresentavam retinopatia, retinopatia proliferativa e edema macular, respectivamente. Para os participantes cuja idade ao diagnóstico de diabetes era inferior a 30 anos e que tomavam insulina (n = 919), as taxas de prevalência de edema macular variaram de 0% naqueles com diabetes há menos de 5 anos a 29% naqueles cuja duração do diabetes tinha 20 anos ou mais. Nessas pessoas, o edema macular foi associado a maior duração do diabetes, presença de proteinúria, uso de diuréticos, sexo masculino e maior hemoglobina glicada. Para aqueles cuja idade no diagnóstico foi de 30 anos ou mais (n = 1.121), as taxas de prevalência de edema macular variaram de 3% naqueles com diabetes há menos de 5 anos a 28% naqueles cuja duração do diabetes foi de 20 anos ou mais. Nessas pessoas, a presença de edema macular foi associada a uma duração mais longa do diabetes, pressão arterial sistólica mais alta, uso de insulina, hemoglobina glicosilada mais alta e presença de proteinúria (Klein *et al.*, 1984).

### 2.3.4 Triagem para retinopatia diabética

As diretrizes mais recentes para o rastreio da RD foram publicadas pelo Conselho Internacional de Oftalmologia (ICO) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) em 2018. As diretrizes de 2018 do ICO/ADA indicam que o rastreio adequado da RD deve incluir um exame de acuidade visual e um exame da retina (Wong *et al.*, 2018).

**O rastreio adequado da acuidade visual inclui, pelo menos, um dos seguintes elementos:** exame da acuidade visual corrigida, utilizando uma tabela de acuidade visual de 3 ou 4 m de alto contraste; ou a acuidade visual utilizando uma tabela para perto ou para longe e um “*pin hole*” se a acuidade visual for reduzida; ou apresentação de um exame de acuidade visual utilizando uma tabela manual equivalente a 6/12 (20/40) composta por, pelo menos, 5 letras ou símbolos normalizados associado a um “*pin hole*” se a acuidade visual for reduzida (Wong *et al.*, 2018).

**Um exame adequado da retina inclui, pelo menos, um dos seguintes:** oftalmoscopia direta ou indireta ou exame biomicroscópico da retina com lâmpada de fenda ou fotografia da retina (fundo de olho), incluindo qualquer um dos seguintes: 30° a campo amplo, monofotografia ou estereofotografia, e fotografia dilatada ou não dilatada . O exame da retina

pode ser feito com ou sem tomografia de coerência ótica (OCT). O exame da retina pode não ter de ser realizado por indivíduos com uma licenciatura em medicina, desde que tenham formação para realizar oftalmoscopia ou fotografia da retina e possam avaliar a gravidade da doença (Wong *et al.*, 2018).

Com base nas diretrizes recentes do AAO Diabetic Retinopathy Preferred Practice Patter, as recomendações para o primeiro exame de triagem para retinopatia diabética: DM tipo 1: 1.º exame da retina 3-5 anos após o diagnóstico. DM tipo 2: 1.º exame de retina na altura do diagnóstico. Gravidez (com tipo 1 ou tipo 2): 1.º exame da retina logo após a concepção e no início do 1.º trimestre de gravidez. Não é necessário um exame oftalmológico se as doentes sem DM desenvolverem recentemente diabetes gestacional durante a gravidez (Flaxel *et al.*, 2020).

O exame de fundo de olho dilatado efetuado por um oftalmologista é considerado o método padrão de ouro para diagnosticar a RD e monitorizar os doentes em risco de desenvolver RD; no entanto, um exame anual num contexto de recursos limitados revelar-se-ia inviável, dada a crescente lacuna no acesso aos profissionais de saúde ocular (Resnikoff *et al.*, 2012). Com os recentes avanços tecnológicos, a maioria dos programas de rastreio está em transição para o rastreio baseado na fotografia da retina (Das *et al.*, 2021). Estudos recentes indicaram que os programas de rastreio fotográfico são eficazes em termos de custos/benefício para populações com mais de 3500 indivíduos com idades compreendidas entre os 50 e os 80 anos e podem gerar uma poupança de 127 dólares por cada indivíduo com diabetes rastreado ao longo da sua vida (Avidor *et al.*, 2020).

Uma vez que os sinais da retina na retinopatia diabética podem frequentemente estar localizadas na periferia da retina, melhores métodos de deteção e rastreio com a utilização de imagens de campo ultra amplo podem ser aplicados. Atualmente, existem três métodos para obter imagens de campo amplo da periferia da retina: 1) criar montagens a partir de imagens convencionais adquiridas individualmente com direção, 2) utilizar uma lente especial de alto índice (de contato ou sem contato) em conjunto com uma câmara convencional e 3) utilizar um sistema de câmara de grande angular dedicado. A fotografia de retina de campo ultra largo (UWF) desenvolveu-se a partir da oftalmoscopia confocal de varrimento a laser para proporcionar vistas periféricas de quase toda a retina (até 200 graus, representando aproximadamente 82,5% da superfície total da retina) numa única captura (Xiao *et al.*, 2023).

A maioria dos estudos que comparam a retinografia de campo ultra amplo com os métodos tradicionais de deteção de RD determinaram que a sensibilidade e a especificidade são semelhantes. Estudos compararam imagens UWF não midriáticas com o exame clínico e concluíram que a UWF detectava a RD com uma sensibilidade de 94% (Friberg; Pandya; Eller,

2003). Outros concluíram que, para casos mais graves do que NPDR leve, a UWF tinha uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 100% quando comparada com o exame oftalmológico midriático no local (Neubauer *et al.*, 2008).

Embora haja benefícios, incluindo a diminuição da necessidade de medicamentos dilatadores e a fácil aquisição de imagens com a fotografia da retina, há relatos de elevadas taxas de falhas técnicas e a dependência contínua de um classificador de imagens treinado (Avidor *et al.*, 2020). É necessário um acompanhamento consistente dos resultados do rastreio para um programa de tele retina, e os sistemas de saúde devem estar preparados para os custos iniciais da implementação destes sistemas (Chasan *et al.*, 2014). No entanto, a implementação mais difundida da fotografia da retina em vários contextos, como clínicas de cuidados primários, áreas remotas sem oftalmologistas e populações carentes, irá certamente melhorar a detecção da RD e o acesso aos cuidados.

A normalização de um método consistente para analisar fotografias da retina é de grande interesse, e os primeiros métodos de inteligência artificial (IA) parecem ser promissores. Estas soluções tecnológicas reduzem a necessidade de classificadores treinados no contexto dos cuidados primários e permitem um rastreio mais eficiente. A IA reduz o ônus da revisão manual das fotografias de fundo de olho, utilizando a tecnologia para analisar automaticamente as imagens de fundo de olho para detectar a presença de doença. Uma análise sistêmica do desempenho da IA no rastreio da RD demonstra que estas tecnologias têm uma sensibilidade elevada (87,0%-95,2%), mas geralmente uma especificidade baixa (49,6-68,8%) (Nørgaard; Grauslund, 2018).

### 2.3 AS LÁGRIMAS

As lágrimas desempenham um papel fundamental na saúde visual e ocular, atuando como um fluido nutritivo de metabolitos para as células da córnea e da conjuntiva, formando uma superfície refrativa indispensável para a formação e interpretação clara das imagens, bem como atuando como uma barreira física, química e imunológica contra agentes potencialmente patológicos e antígenos (Pflugfelder; Stern, 2020).

O filme lacrimal normal contém um conjunto rigorosamente controlado de íons, proteínas e lípidos que lhe permitem cumprir as suas funções básicas. Talvez a sua função mais importante seja manter a superfície ótica primária do olho (Tutt *et al.*, 2000). Outra função do filme lacrimal normal é a proteção do epitélio da superfície ocular contra os insultos ambientais sofridos diariamente. Estas incluem micróbios, poluentes, alérgenos e condições ambientais

adversas, como a baixa humidade e o movimento rápido do ar provocado pelo vento. Isto é conseguido através da secreção regulada de fluídos que contém fatores de proteção, incluindo glicoproteínas hidratantes e antimicrobianos (por exemplo, IgA, lactoferrina, lisozima e defensas (Hagan; Martin; Enríquez-de-Salamanca, 2016).

Um estudo utilizou a espectrometria de massa em tandem de cromatografia líquida dirigida por aquisição dependente de informações, a mineração de pico correspondente ao padrão de isótopos foi realizada usando o gerenciador Extracted Ion Chromatogram no software PeakView. Sessenta metabólitos representando diversas classes de compostos foram identificados em lágrimas humanas (Chen *et al.*, 2011).

Figura 5 - Metabólitos detectados em lágrimas pela IDA LC MS/MS Peak Mining

<b>Amino Acids</b>	<b>Aromatic Acids</b>	<b>Nucleotides</b>
1-Methylhistidine/	Cinnamic acid	ADP <sup>a</sup>
3-Methylhistidine	<i>o</i> -Coumaric acid/	AMP
Arginine <sup>a,b</sup>	<i>m</i> -Coumaric acid/	CMP
Asymmetric dimethylarginine/	<i>p</i> -Coumaric acid	Cytidine diphosphate choline
Symmetric dimethylarginine		GMP
Citrulline <sup>b</sup>	<b>Carbohydrates</b>	IMP
Creatine	<i>N</i> -Acetylneuraminic acid	UDP
Glutamic acid <sup>b</sup>		UMP
Glutamine <sup>a,b</sup>	<b>Carnitines</b>	UDP- <i>N</i> -acetylgalactosamine/
Homoarginine	Acetylcarnitine <sup>d</sup>	UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine
Hydroxyproline	Carnitine <sup>a,d</sup>	
Phenylalanine <sup>b</sup>	Hexanoylcarnitine	<b>Peptides</b>
Proline <sup>b</sup>	Palmitoylcarnitine <sup>d</sup>	Oxidized glutathione
Pyroglutamic acid		
Serine <sup>b</sup>	<b>Cyclic Amines</b>	<b>Phospholipids</b>
Taurine <sup>b</sup>	Niacinamide	1-Palmitoyl- lysophosphatidylcholine
Threonine <sup>b</sup>		
Tryptophan <sup>a,b</sup>	<b>Dicarboxylic Acids</b>	<b>Purines and derivatives</b>
Tyrosine <sup>a,c</sup>	Fumaric acid/Maleic acid	Hypoxanthine
Urocanic acid		Theobromine
Valine <sup>b</sup>	<b>Nucleosides</b>	Uric acid <sup>a,e</sup>
	1-Methyladenosine	Xanthine <sup>d</sup>
<b>Amino Alcohols</b>	Adenosine	
Panthenol <sup>a</sup>	Cytidine	<b>Pyridoxals and derivatives</b>
	Guanosine	4-Pyridoxic acid
<b>Amino Ketones</b>	Inosine	
Allantoin <sup>a</sup>	<i>S</i> -Adenosyl-homocysteine	<b>Quaternary Amines</b>
Creatinine	<i>S</i> -Adenosyl-methionine	Acetylcholine
	Uridine	Glycerolphosphocholine
	Xanthosine	Phosphocholine
		<b>Tricarboxylic Acids</b>
		Citric acid <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Verified with standard. <sup>b</sup> Reported in ref 12. <sup>c</sup> Reported in refs 12–14. <sup>d</sup> Reported in ref 19. <sup>e</sup> Reported in refs 13, 14, and 23.

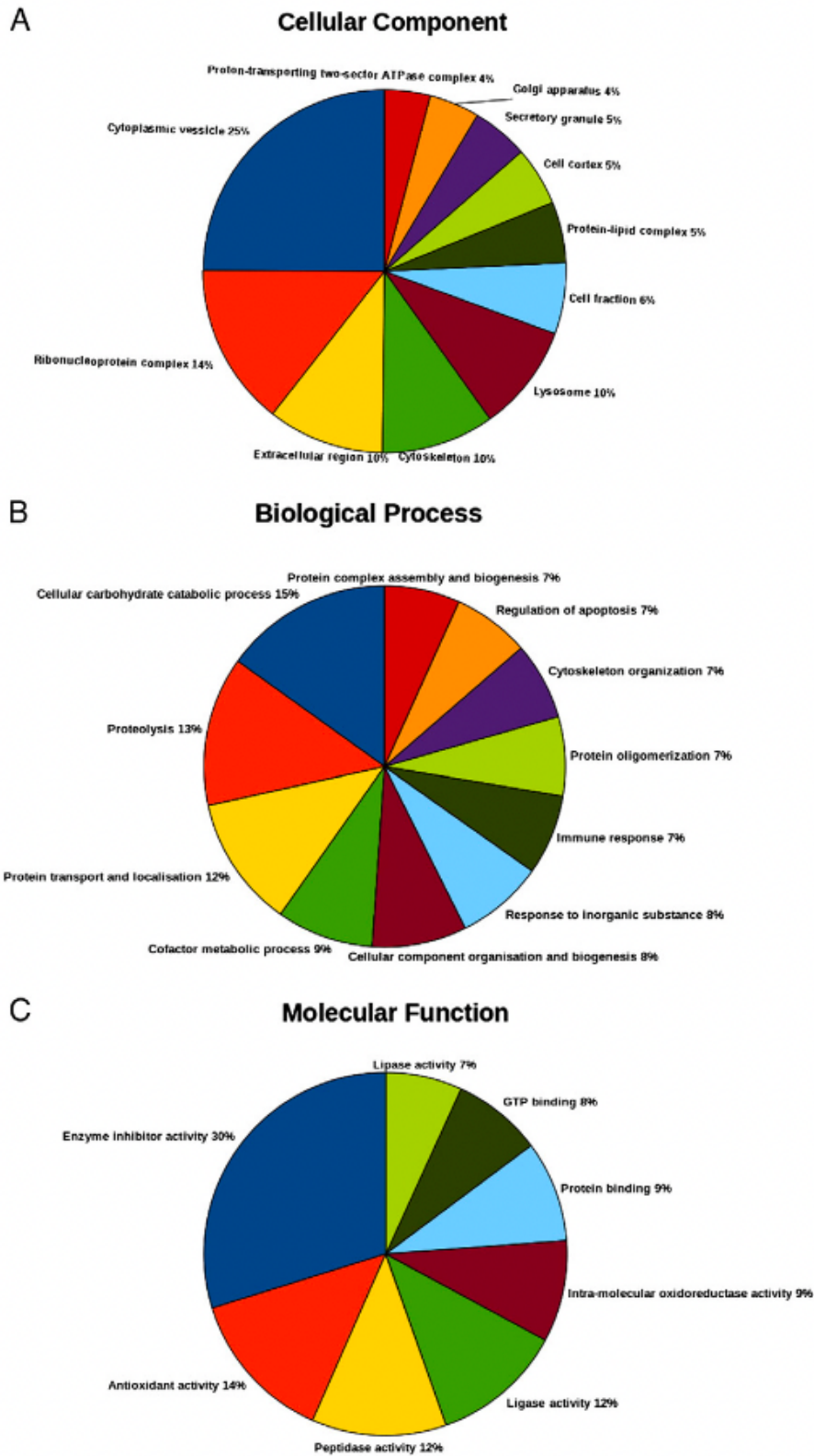
Fonte: (Chen *et al.*, 2011)

Um estudo que usou um sistema TripleTOF 5600 de alta velocidade como plataforma para analisar o proteoma lacrimal humano de indivíduos saudáveis (3 mulheres e 1 homem,

idade média:  $36 \pm 14$ ), identificou 1.543 proteínas nas lágrimas com menos de 1% de taxa de descoberta falsa. O conjunto de dados foi analisado para ontologia genética e comparado com o proteoma do plasma humano, o conjunto de dados do gene da glândula lacrimal NEIBank e o conjunto de dados do gene da córnea NEIBank (Zhou *et al.*, 2012).

A classificação baseada no processo biológico, revelou que essas proteínas estão envolvidas principalmente no processo catabólico de carboidratos celulares (15%), proteólise (13%), transporte e localização de proteínas (12%), processo metabólico de cofatores (9%), organização de componentes celulares e biogênese (8%), resposta a substância inorgânica (8%), resposta imune (7%), oligomerização de proteínas (7%), organização do citoesqueleto (7%), regulação da apoptose (7%) e montagem e biogênese de complexos proteicos (7%). Para a função molecular, várias subcategorias principais são atividade inibidora enzimática (30%), atividade antioxidante (14%), atividade peptidase (12%), atividade ligase (12%), atividade intramolecular de oxidoredutase (9%), ligação a proteínas (9%), ligação ao GTP (8%) e atividade lipase (7%) (Zhou *et al.*, 2012).

Figura 6 – Análise de ontologia genética de proteínas lacrimais humanas identificadas neste estudo com base na ferramenta DAVID. (A) Componente celular; (B) processo biológico; (C) função molecular.



Fonte: (Zhou *et al.*, 2012)

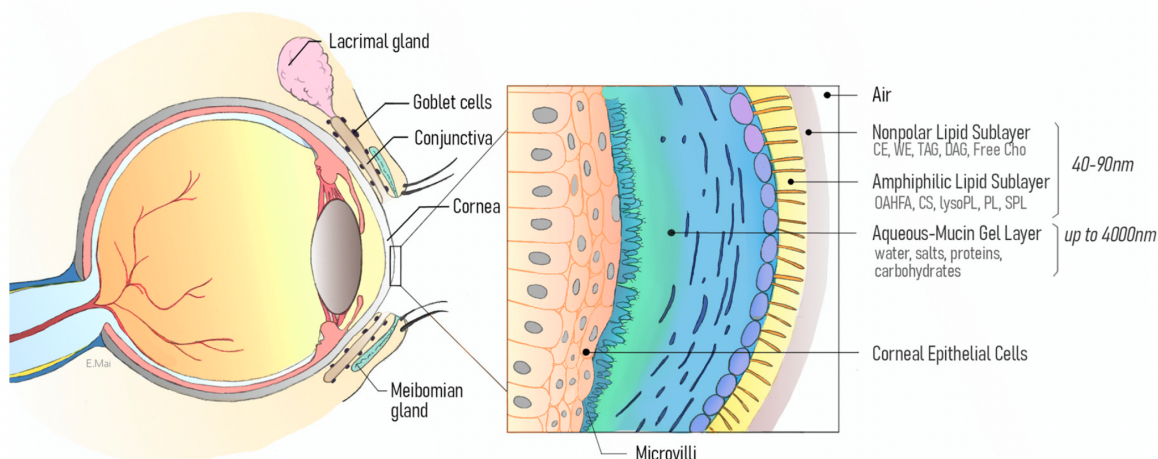
Um estudo explorou o lipidoma do fluido lacrimal aquoso humano com ênfase na identificação dos principais lipídios. As lágrimas foram analisadas por meio de técnicas cromatográficas em camada delgada, enzimáticas e espectrométricas de massa. Com base na análise enzimática, as respectivas concentrações de lipídios, triglicerídeos e ésteres de colesterol contendo colina foram  $48 \pm 14$ ,  $10 \pm 0$  e  $21 \pm 18$   $\mu\text{M}$ . A análise de espectrometria de massa de tempo de voo quádruplo por cromatografia líquida de ultra desempenho mostrou que a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina eram os dois lipídios polares mais comuns, compreendendo  $88 \pm 6\%$  de todos os lipídios identificados. Os triglicerídeos foram os únicos lipídios não polares detectados na análise de espectrometria de massa, ou seja, nenhum éster de colesterol ou cera foi identificado. As experiências de dispersão mostram que a presença de lípidos polares é uma necessidade absoluta para uma dispersão adequada de lípidos não polares do fluido lacrimal (Rantamäki *et al.*, 2011).

O filme lacrimal tem como função proporcionar um ambiente trófico aos tecidos epiteliais da superfície ocular. A integridade e a função secretora do epitélio são importantes para manter o seu papel de barreira inata e "selar" a extensa rede de terminações nervosas livres do epitélio (Pflugfelder; Stern, 2020).

O aparelho lacrimal é anatomicamente constituído pelas glândulas secretoras (glândulas lacrimais principais e acessórias, glândulas de Meibômio e células caliciformes do epitélio conjuntival), pela superfície ocular, pelas pálpebras, pelo sistema de drenagem lacrimal, pelo sistema imunitário glandular e mucoso e pela inervação correspondente. A componente neural do aparelho lacrimal é constituída por um circuito reflexo que se inicia na córnea, altamente innervada, com tráfego de aferentes para o sistema nervoso central, incluindo o tronco cerebral e o córtex cerebral. Estas aferências, juntamente com os centros emocionais no cérebro, projetam-se para os nervos eferentes secretores e motores para impulsionar a produção de lágrimas e o pestanejar. As vias eferentes terminam nas glândulas lacrimais principais e acessórias, nas células caliciformes conjuntivais e nas glândulas meibomianas, indicando que a secreção de todos os principais componentes do filme lacrimal é rigorosamente controlada para manter uma composição lacrimal homeostática normal (Pflugfelder; Stern, 2020). A fina camada lacrimal (3-40  $\mu\text{m}$ ) está organizada numa camada lipídica exterior (15-160 nm, camada lipídica apolar e polar com proteínas intercaladas), fase aquosa intermédia (proteínas, metabolitos de pequenas moléculas, eletrólitos, gel formador de mucina, etc.) e camada interna de glicocálix (glicoproteínas transmembranares, mucinas) que liga a película lacrimal às células epiteliais da superfície da córnea (Green-Church *et al.*, 2011).



Figura 7 – Representação e composição do filme lacrimal humano. CE = éster de colesterol; WE = Éster de cera; TAG = Triacilglicerol; DAG = Diacilglicerol; Cho Livre = Colesterol Livre; OAHFA = (O-Acil)- $\omega$ -Hidroxi Ácidos Graxos; CS = sulfato de colesterol; PL = Fosfolipídios; SPL = Esfingofosfolipídios.



Fonte: (Khanna *et al.*, 2022)

### 2.3.1 Uso das lágrimas como fluido diagnóstico

Em um estudo utilizou-se amostras de lágrimas analisadas por espectroscopia por FTIR, combinadas com técnicas estatísticas avançadas; com o intuito de discriminar os sujeitos normais daqueles com diferentes patologias oculares, como ceratocone e doenças inflamatórias oculares (conjuntivites, rosácea, olho seco, hipersensibilidade e alergia) (Travo *et al.*, 2014).

O estudo da metabolômica do fluido lacrimal, realizado através de cromatografia líquida/espectrometria de massa (LC-MS), utilizando amostras de lágrimas coletadas utilizando fitas de papel de Schirmer, identificou 60 metabolitos em lágrimas humanas, englobando uma vasta gama de classes de compostos (Chen *et al.*, 2011).

Uma pesquisa, que utilizou espectrometria de massa de alta velocidade como plataforma para analisar o proteoma da lágrima humana de indivíduos saudáveis, identificou 1543 proteínas nas lágrimas, com excelente reprodutibilidade. Esta lista exaustiva de proteínas lacrimais pode ser utilizada como lista de referência do proteoma lacrimal humano para a pesquisa de biomarcadores de doenças oculares (Zhou *et al.*, 2012).

Outro grupo, através de um painel de seis proteínas metabólicas (leptina; insulina; glucagon; peptídeo semelhante ao glucagon [GLP]-1 total; grelina ativa e peptídeo C) utilizando o Human Metabolic Hormone Magnetic Bead Panel (Milliplex, Merck Millipore, Reino Unido); estudou lágrimas de sujeitos com síndrome de olho seco e diabetes tipo 2; relacionando

com a qualidade de vida através de questionários específicos. Houve correlação das concentrações de IL-6 e IL-8 no fluido lacrimal com vários sinais clínicos de olho seco e diabetes tipo 2 e podem potencialmente ser biomarcadores de diagnóstico de síndrome do olho seco relacionada com o diabetes tipo 2 (Byambajav *et al.*, 2023).

#### 2.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

FTIR significa infravermelho com transformada de Fourier, o método preferido de espectroscopia de infravermelhos (IV). Na espectroscopia de IV, a radiação de IV é passada através de uma amostra. Parte da radiação IV é absorvida pela amostra e outra parte é passada através dela (transmitida). O espectro resultante representa a absorção e transmissão molecular, criando uma impressão digital molecular da amostra. Tal como duas impressões digitais nunca coincidem, da mesma forma, não existem duas estruturas moleculares únicas que produzam o mesmo espectro de IV. Este fato torna a espectroscopia de IV útil para vários tipos de análise. Há mais de 70 anos que a espectroscopia de IV tem sido uma técnica de grande utilidade para a análise de materiais em laboratório. Um espectro de IV representa a impressão digital de uma amostra, com picos de absorção que correspondem às frequências de vibração entre as ligações dos átomos que constituem o material (Dutta, 2017).

A espectroscopia de IV pode resultar numa identificação positiva (análise qualitativa) de qualquer tipo de material. Além disso, o tamanho de um pico no espectro é uma indicação direta da quantidade de material presente. Com os modernos algoritmos de software, a IR é uma excelente ferramenta para a análise quantitativa. Os instrumentos de IV originais eram do tipo dispersivo. Estes instrumentos separavam as frequências individuais de energia emitida pela fonte de IV. Isto era conseguido através da utilização de um prisma ou grelha. Um prisma IR funciona exatamente da mesma forma que um prisma visível, que separa a luz visível nas suas cores (frequências). Uma grelha é uma parte dispersiva mais moderna de um instrumento espectroscópico IR, que separa melhor as frequências da energia IR. O detetor mede a quantidade de energia em cada frequência que passou pela amostra. Isto resulta num espectro, que é um gráfico de intensidade versus frequência (Dutta, 2017).

A espectroscopia FTIR é preferível aos métodos dispersivos ou de filtragem da análise espectral de IV por várias razões: é uma técnica não destrutiva. Fornece um método de medição preciso que não requer calibração externa. Pode aumentar a velocidade, analisando um registo a cada segundo. Melhora a sensibilidade, uma vez que pode registar um registo a cada segundo

e estes podem ser somados para eliminar o ruído aleatório. Tem um maior rendimento ótico. É mecanicamente simples, com apenas uma peça móvel (Dutta, 2017).

A espectrometria FTIR foi desenvolvida para ultrapassar as limitações encontradas nos instrumentos dispersivos. A principal dificuldade era o processo de varredura lento. Era necessário um método para medir todas as frequências de IV simultaneamente, em vez de individualmente. Foi desenvolvida uma solução, um dispositivo ótico chamado interferômetro. O interferômetro produziu um tipo único de sinal, que tinha todas as frequências de IV "codificadas" nele. Como o sinal era medido em segundos, o elemento de tempo por amostra foi reduzido (Dutta, 2017).

A maioria dos interferômetros utiliza um divisor de feixe, que recebe o feixe de infravermelhos de entrada e o divide em dois feixes óticos. Um feixe reflete-se num espelho plano que está fixo no seu lugar. O outro feixe reflete-se num espelho plano que tem um mecanismo que permite que este espelho se mova a uma distância muito curta (normalmente alguns milímetros) do divisor de feixe. Como o caminho percorrido por um feixe tem um comprimento fixo e o outro está constantemente a mudar à medida que o seu espelho se move, o sinal que sai do interferômetro é o resultado da "interferência" destes dois feixes. O sinal resultante é chamado de interferograma. A região do infravermelho é normalmente dividida em três áreas: infravermelho próximo (400 - 10  $\text{cm}^{-1}$ ), infravermelho médio (4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ ) e infravermelho distante (14.000 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Os fótons de IV têm energia suficiente para fazer vibrar grupos de átomos em relação às ligações que os unem (Dutta, 2017).

Tal como as transições eletrônicas, as transições vibracionais correspondem a energias distintas, e as moléculas absorvem a radiação IV apenas em determinados comprimentos de onda e frequências. As ligações químicas vibram em frequências características e, quando expostas à radiação IV, absorvem a radiação em frequências que correspondem aos seus modos de vibração. A medida da frequência de absorção da radiação produz um espectro que pode ser utilizado para identificar grupos funcionais e compostos. Algumas impurezas produzem as suas próprias bandas características na região do IV. As medidas espectrais destas bandas são utilizadas para determinar as concentrações de impurezas e a sua ligação ao material hospedeiro. Uma vez que o analista necessita de um espectro de frequência, que é um gráfico da intensidade em cada frequência para fazer a identificação, o sinal do interferograma medido não pode ser interpretado diretamente. É utilizado um meio de "descodificar" as frequências individuais, que é uma técnica matemática bem conhecida chamada transformada de Fourier (FT). A transformada é efetuada por um computador, que apresenta então a informação espectral desejada para análise (Dutta, 2017).

Os três componentes básicos do espectrômetro de FT: uma fonte de radiação, um interferômetro e um detector. O interferômetro divide os feixes de radiação, gera uma diferença de percurso ótico entre os feixes e gera sinais de interferência medidos em função da diferença de percurso ótico pelo detector. Como o seu nome indica, o interferômetro produz sinais de interferência, que contêm informação espectral de IV gerada após a passagem pela amostra. O interferômetro mais utilizado é o interferômetro de Michelson, que consiste em três componentes ativos: um espelho móvel, um espelho fixo e um separador de feixes. Os dois espelhos são perpendiculares um ao outro. O separador de feixes é um dispositivo semi-refletor e é frequentemente fabricado depositando uma película fina de germânio num substrato plano de brometo de potássio (KBr). A radiação da fonte de infravermelhos de banda larga é colimada e dirigida para o interferômetro e incide no separador de feixes (Dutta, 2017).

Amostras em todas as fases podem ser medidas pelos espectros IV, sejam no estado sólido, líquido ou gasoso. Uma gota de um líquido pode ser colocada como um filme entre duas placas de cloreto de sódio (NaCl) ou KBr, que são transparentes à luz IV nas frequências mais importantes. Uma amostra sólida pode ser moída com KBr e depois posta sobre um disco de amostra que depois é analisada pelo feixe de luz. De forma alternativa, uma amostra sólida pode ser moída em uma pasta de óleo de parafina. Como nas amostras líquidas, a pasta residual pode ser colocada entre duas placas de sal. Os sólidos também podem ser dissolvidos em solventes comuns, como o cloreto de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), o tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) ou o dissulfureto de carbono ( $\text{CS}_2$ ), uma vez que não apresentam absorbância nas áreas de interesse.

Os gases são colocados numa célula mais longa cujas janelas são revestidas de sal. Estas células de gás contêm frequentemente espelhos que refletem o feixe através da célula várias vezes para uma absorção mais forte (Dutta, 2017).

O projeto básico do instrumento é bastante simples: (Dutta, 2017)

A fonte: A energia IV é emitida por uma fonte de corpo negro incandescente. Este feixe passa através de uma abertura, que controla a quantidade de energia a incidir na amostra.

O interferômetro: O feixe entra no interferômetro onde tem lugar a "codificação espectral". O sinal resultante do interferograma sai então do interferômetro.

A amostra: O feixe entra no compartimento da amostra, onde é transmitido ou refletido através da superfície da amostra, dependendo do tipo de análise que será feita. É aqui que são absorvidas as frequências específicas de energia, que são exclusivamente características da amostra.

O detector: O feixe passa finalmente para o detector para a medição final. Os detectores utilizados são especialmente concebidos para medir o sinal especial do interferograma.

Grelhas de reflexão (fabricadas em diversos plásticos): O espaçamento entre as ranhuras é maior (por exemplo, 120 ranhuras mm<sup>-1</sup>). Para reduzir o efeito da sobreposição de ordens e da radiação difusa, utilizam-se geralmente filtros ou um prisma anterior. Duas ou mais grelhas são utilizadas com vários filtros para varrer uma vasta região.

Espelho: Os espelhos são utilizados para focar e colimar a radiação infravermelha. São geralmente fabricados em pirex ou noutro material com baixo coeficiente de dilatação térmica. As superfícies frontais são revestidas com uma fina película metálica de alumínio, prata ou ouro depositada à vácuo.

Janelas: As janelas são utilizadas para células de amostra e para isolar vários compartimentos do ambiente. O material escolhido para as janelas deve satisfazer os seguintes critérios: transparente ao infravermelho na região do comprimento de onda; inerte aos produtos químicos que estão sendo analisados; capaz de ser moldado em vários tamanhos e formas.

O computador: O sinal medido é digitalizado e os sinais digitalizados são enviados para o computador onde se efetua a FT. O espectro IV final de intensidade versus frequência é então apresentado ao utilizador para interpretação.

### **3 OBJETIVO**

Determinar as assinaturas digitais nos espectros infravermelhos da lágrima de indivíduos não diabéticos (ND), diabéticos sem retinopatia (D) e com retinopatia diabética (DR) utilizando a espectroscopia ATR-FTIR, combinada com a análise estatística por algoritmos de aprendizagem de máquinas.

## 4 CÓPIA DO ARTIGO:

*Article*

# Application of ATR-FTIR to human tears for discrimination in diabetic retinopathy

Tadashi Ono Júnior<sup>1</sup>, Douglas Carvalho Caixeta<sup>3</sup>, Robinson Sabino Silva<sup>2,3</sup> and Foued Salmen Espindola<sup>1,2,\*</sup>

Affiliation:

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil.

<sup>2</sup>Graduate Program in Health Science, Faculty of Medicine, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil.

<sup>3</sup>Innovation Center in Salivary Diagnostics and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil.

\*Correspondent author: Foued Salmen Espindola - Address: Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia, Rua Acre s/n, Bloco 2E237, 38400-319, Uberlândia, MG, Brazil. Phone: 55+ (34) 999930670, E-mail: foued@ufu.br  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6937-1411>

**Abstract:** Diabetes is now one of the major public health challenges, globally. Prolonged diabetes leads to various diabetic microvascular complications like retinopathy, nephropathy, and neuropathy. Multiple factors are likely to be involved in predisposing diabetic individuals to complications. Early detection or diagnosis is essential in developing strategies to reduce the risk factors and management costs of these diabetic complications. In this study, we employed ATR-FTIR spectroscopy combined with machine learning analysis in tear samples from individuals with diabetic retinopathy, in order to differentiate them from diabetics without retinopathy and people without diabetes. The aim of this study is to use tears as sample for a simple, fast, inexpensive and non-invasive method that can be applied in a remote care setting and that can identify people with diabetic retinopathy. Pre-processing and machine learning tools on the tear spectra of non-diabetics (ND), diabetics without retinopathy (D) and diabetics with retinopathy (DR) were applied in the study. The best algorithm for discriminating between ND and DR groups was AdaBoost, with an accuracy of 0.73, sensitivity of 0.70 and specificity of 0.76. Using SHAP (Shapley Additive Explanations) we identified that the wavenumbers 1151 cm<sup>-1</sup>, 1425 cm<sup>-1</sup>, 993 cm<sup>-1</sup>, 1755 cm<sup>-1</sup>, 1287 cm<sup>-1</sup>, 1725 cm<sup>-1</sup>, 2970 cm<sup>-1</sup>, 2989 cm<sup>-1</sup>, 1129 cm<sup>-1</sup>, and 1088 cm<sup>-1</sup>, were the most important in differentiating between the two groups above. The main corresponding biomolecular components are carbohydrates and lipids. As for D group compared to DR group, the best test was Artificial Neural Networks, showing an accuracy of 0.73, sensitivity of 0.77 and specificity of 0.70. The most important wavenumbers in this method were 1256 cm<sup>-1</sup>, 1647 cm<sup>-1</sup>, 2899 cm<sup>-1</sup>, 1414 cm<sup>-1</sup>, 2879 cm<sup>-1</sup>, 1075 cm<sup>-1</sup>, 1179 cm<sup>-1</sup>, 929 cm<sup>-1</sup>, 916 cm<sup>-1</sup>, and 903 cm<sup>-1</sup>. The three most important biomolecular components are nucleic acids, proteins and lipids. In summary, the research results highlight the use of ATR-FTIR spectroscopy coupled with machine learning analysis as a way of discriminating subjects with diabetic retinopathy.

**Keywords:** ATR-FTIR spectroscopy, tears, diabetic retinopathy, machine learning.

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM), or more commonly just called diabetes, is a chronic degenerative disease in which the individual has increased blood glucose levels as a result of insufficient production of the hormone insulin or inadequate use of insulin by the body. According to the IDF Diabetes Atlas, 10th edition, in 2021, the prevalence of diabetes in adults aged 20-79 was estimated at 536 million people worldwide (10% of the population). An increase of 16% is expected by 2045 due to the ageing of the population. Diabetes imposes a major economic impact on countries and their health systems, as well as morbidity for the person and their family [1].

The microvascular complications of diabetes occur as a result of hyperglycemia, which triggers biochemical processes in the body, culminating in dysfunction of cells and tissues [2]; as demonstrated by the pivotal studies DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) [3] and UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) [4]. Some cells, such as those of the vascular endothelium, glomeruli and neurons, are unable to down-regulate the intracellular glucose concentration, resulting in microvascular damage [5]. The biochemical pathogenic mechanisms of diabetic retinopathy involve the aldose reductase theory, advanced glycation end products, reactive oxygen species, protein kinase C and insulin receptors and glucose transporters [5]. The loss of pericytes from the retinal microcapillaries, leading to alterations in the endothelial cell junctions and breakdown of the blood barrier; as well as venous dilation and tortuosity; thickening of the basement membrane; the formation of microaneurysms and finally capillary acellularity; are histopathological findings of diabetic retinopathy [5]. This leads to increased capillary permeability, vascular occlusions, ischemia, promotion of new vessels and retinal hemorrhages [6]. It is the most common cause of preventable blindness in the working-age population in developed countries [7]. The prevalence of diabetic retinopathy in 2020 was estimated at 22% globally in the diabetic population [8].

Tears play a key role in visual and ocular health, acting as a nourishing fluid of metabolites for corneal and conjunctival cells, forming an indispensable refractive surface for the formation and clear interpretation of images, as well as acting as a physical, chemical and immunological barrier against potentially pathological agents and antigens [9]. The lacrimal apparatus is anatomically made up of the secretory glands (main and accessory lacrimal glands, the Meibomian glands and the goblet cells of the conjunctival epithelium), the ocular surface, the eyelids, the lacrimal drainage system, the glandular and mucosal immune system and the corresponding innervation. The neural component of the lacrimal apparatus consists of a reflex circuit that begins in the highly innervated cornea with afferent traffic to the central nervous system, including the brainstem and cerebral cortex. These afferents, together with the emotional centers in the brain, project to the secretory and motor efferent nerves to drive tear production and blinking. The efferent pathways end



in the main and accessory lacrimal glands, the conjunctival goblet cells and the meibomian glands, indicating that the secretion of all the main components of the tear film is tightly controlled to maintain a normal homeostatic tear composition [9]. The thin tears layer (3-40  $\mu\text{m}$ ) is organized into an outer lipid layer (15-160 nm, apolar and polar lipid layer with interspersed proteins), middle aqueous phase (proteins, small molecule metabolites, electrolytes, mucin-forming gel, etc.) and inner glycocalyx layer (transmembrane glycoproteins, mucins) that connects the tear film to the epithelial cells of the corneal surface [10]. Any dysfunction or pathology of an ocular tissue, for example, leads to biochemical changes in the tear film.

Attenuated total reflectance (ATR) stands out as the predominant sampling technique in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, enjoying widespread utilization. It can be used to optically probe the molecular changes in the target samples. The method is used to find more conservative ways of assessing characteristics of tissue, cells or fluids that allow precise assignment of functional groups, bond types and molecular conformations. Spectral wavenumbers are specific to the molecule and provide direct information on biochemical composition [11]. Laboratory analysis of various biologic fluids, such as serum, plasma, saliva and urine, using ATR-FTIR spectroscopy over the last few decades has revealed many scientific discoveries that are useful for understanding various diseases [12–14]. Tears have also been the target of research using this tool [15].

To date, there is no scientific work in the literature specifically involving the analysis of tears in subjects with diabetic retinopathy using spectroscopic methods such as ATR-FTIR.

This study aims to determine discrepancies between the infrared spectra of non-diabetic (ND), diabetic subjects without retinopathy (D) and those with diabetic retinopathy (DR); using ATR-FTIR spectroscopy; combined with statistical analysis by machine learning algorithms. Different vibrational modes could discriminate subjects with diabetic retinopathy from others. Thus, contributing both to improving screening/diagnosis and to understanding the pathophysiological mechanisms of diabetic retinopathy.

## 2. Results

### 2.1 Characterization of study subjects:

The demographic and biochemical data of the study population sample are described in Table 1.

Among the variables gender and type of diabetes, there were no statistically significant differences between the groups compared. When analyzing age in years, there were no statistically significant differences between the three groups. Glycated hemoglobin (HbA1C%) showed no statistical difference between the groups when comparing diabetic group (mean 8.3) and diabetic retinopathy (mean 8.4).

Only the variable duration of diabetes was statistically significant when comparing the diabetic retinopathy group (mean 24 years) with the diabetic group (mean 9 years), which can obviously be explained by the

natural evolution of the microvascular complications of diabetes, which correlate directly with a longer duration of the disease.

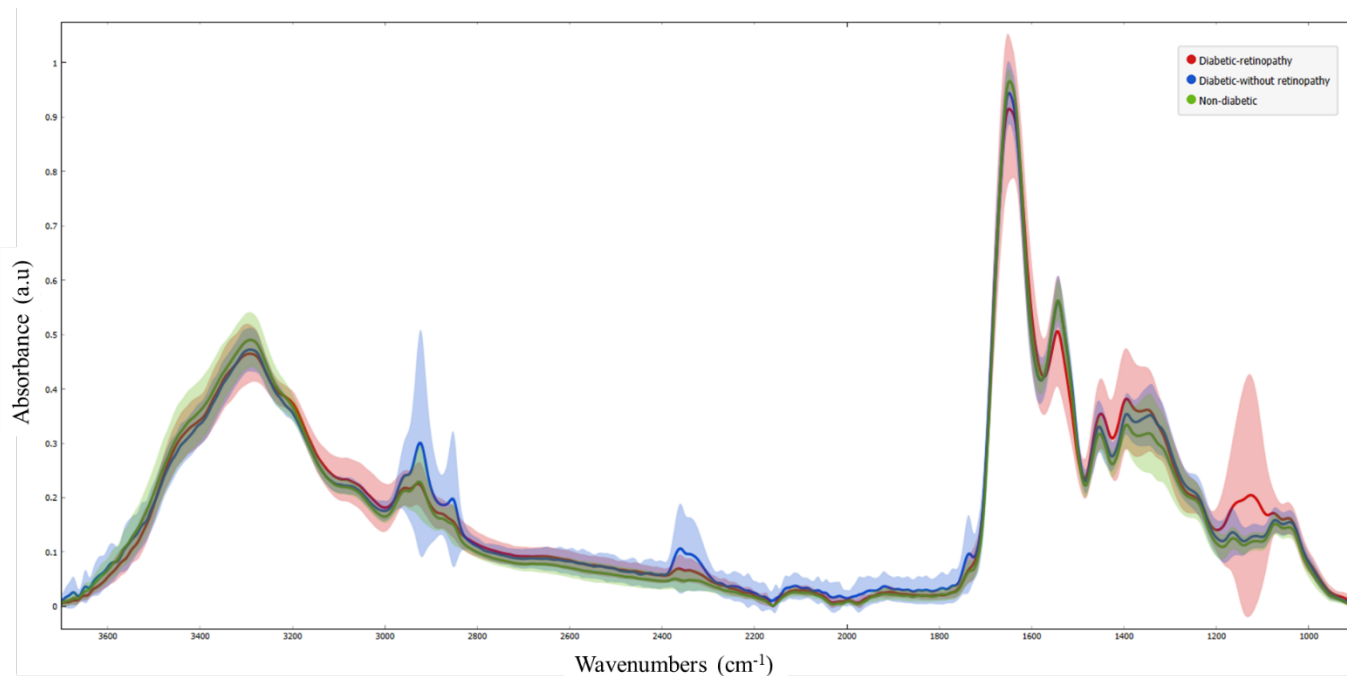
Sample characteristics	Não diabéticos N (24)	Diabetics N (17)	Diabetic retinopathy N (18)
<b>Total (59)</b>			
Male	13 (54%)	7 (41%)	12 (66%)
Female	11 (46%)	10 (59%)	06 (34%)
Age in years (mean / SD)	57±16	60±18	57±7
Type of Diabetes			
I	-	2 (12%)	4 (23%)
II	-	15 (88%)	14 (77%)
Years of diabetes (mean / SD)		9 ± 6	24 ± 8* (p<0.05)
HbA1C% (mean / SD)	-	8.4 ± 2.5	8.3 ± 1.8
Classification of Diabetic Retinopathy			
Mild non proliferative		-	2 (11%)
Moderate non proliferative		-	2 (11%)
Severe non proliferative		-	-
Proliferative		-	13 (72%)
Not determined		-	1(5%)
Antidiabetics drugs in use			
Acarbose		-	-
GLP-1 R agonists		-	-
Biguanides		15 (88%)	9(50%)
Insulin		7 (41%)	13(72%)
Gliptins		-	1(5%)
Glifozins		-	2(11%)
Meglitinides		-	-
Sulfonylureas		3 (17%)	6(33%)
Thiazolidinediones		-	-

Values expressed as mean ± SD or percentage.

\* Significantly different when comparing the diabetic retinopathy group versus diabetics (p < 0.05).

## 2.2 ATR-FTIR analysis of the tears of non-diabetic, diabetics without retinopathy and diabetics with retinopathy subjects

A representative average infrared spectrum of tears from non-diabetic (ND), diabetic without retinopathy (D), and diabetic-retinopathy (DR) is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Representative average ATR-FTIR spectra (3700–900  $\text{cm}^{-1}$ ) in tears of non-diabetic, diabetic without retinopathy and diabetic retinopathy subjects.

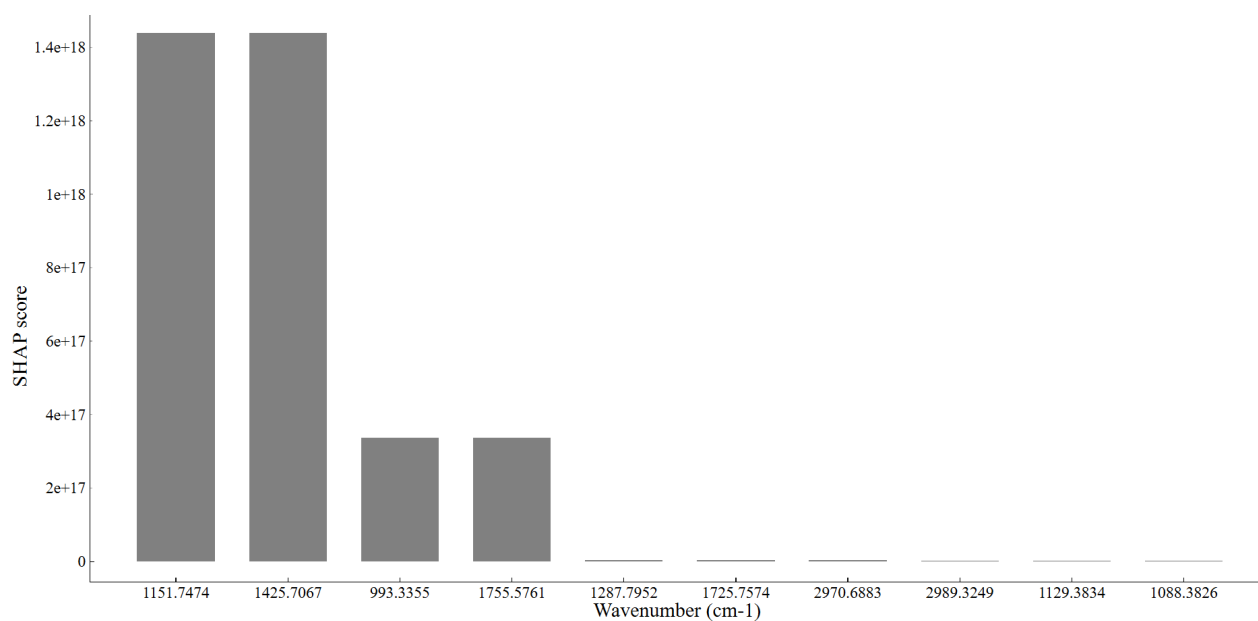
In order to classify and discriminate tear spectral samples from patients groups ND, D and DR with greater reliability, artificial intelligence tools were applied, most notably machine learning with AdaBoost, Artificial Neural Networks analysis, Random Forest, and Support Vector Machine. The classification of tear infrared spectra by machine learning is described in Table 2. The results obtained in these analyses indicate that the best discrimination was the AdaBoost algorithm for ND compared to DR groups. The Artificial Neural Networks algorithm was more appropriate to compare D to DR patients. The Savitzky–Golay smoothing filter, followed by Min-Max normalization and Rubberband baseline, were used as pre-processing spectra tools. The best result was obtained using the 3050–2800  $\text{cm}^{-1}$  along with 1800–900  $\text{cm}^{-1}$ . The AdaBoost algorithm classification of tear infrared spectra showed a sensitivity of 70%, specificity of 76%, and accuracy of 73% between ND and DR patients. The Artificial Neural Networks algorithm demonstrated a sensitivity of 77%, specificity of 70%, and accuracy of 73% when distinguishing between patients of D and DR conditions (Table 2).

**Table 2.** Machine learning algorithms applied in salivary spectra to discriminate diabetic-retinopathy (DR) with non-diabetic individuals (ND) and diabetic patients without retinopathy (D)

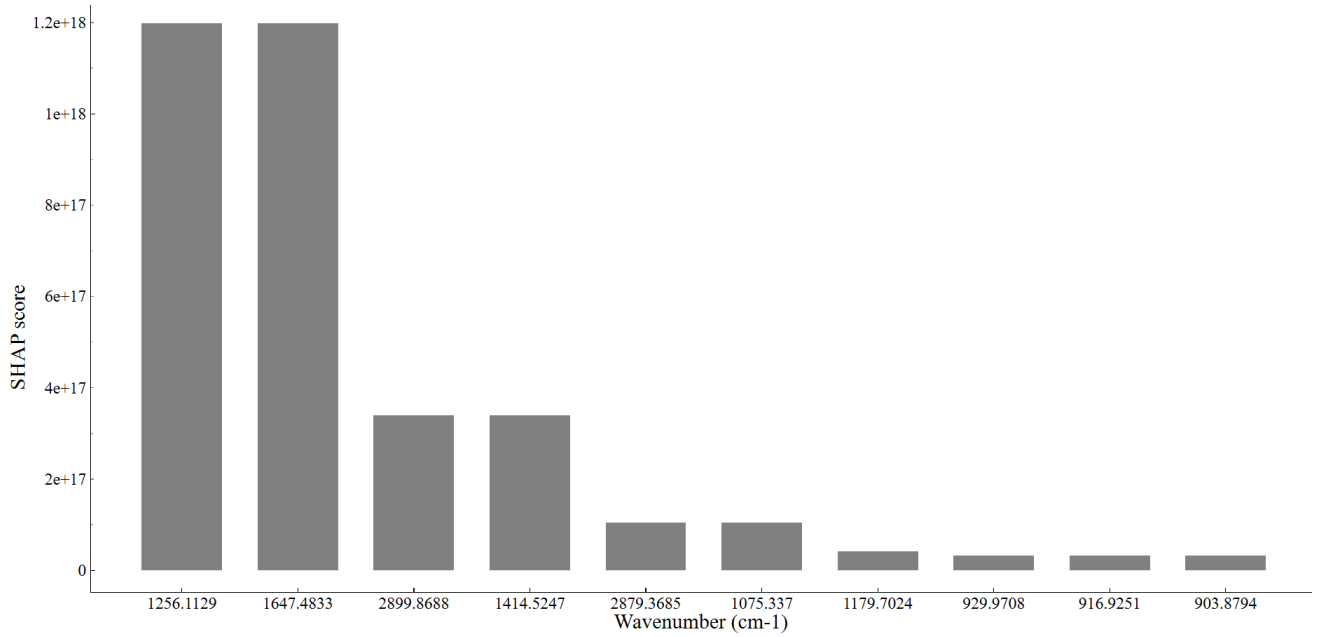
Analysis	Spectral pre-processing	Algorithm	Accuracy	Sensitivity	Specificity
ND x DR	Raw data (3050-2800 cm <sup>-1</sup> ; 1800-900 cm <sup>-1</sup> )	AdaBoost	0.52	0.30	0.66
		Artificial Neural Networks	0.56	0.53	0.57
		Random Forest	0.55	0.30	0.71
		Support Vector Machine	0.47	0.07	0.71
ND x DR	Min-Max normalization + Rubberband (3050-2800 cm <sup>-1</sup> ; 1800-900 cm <sup>-1</sup> )	<b>AdaBoost</b>	<b>0.73</b>	<b>0.70</b>	<b>0.76</b>
		Artificial Neural Networks	0.64	0.61	0.66
		Random Forest	0.70	0.46	0.85
		Support Vector Machine	0.61	0.15	0.90
D x DR	Raw data (3050-2800 cm <sup>-1</sup> ; 1800-900 cm <sup>-1</sup> )	AdaBoost	0.42	0.53	0.30
		Artificial Neural Networks	0.69	0.77	0.61
		Random Forest	0.61	0.53	0.69
		Support Vector Machine	0.11	0.23	0.0
D x DR	Min-Max normalization + Rubberband (3050-2800 cm <sup>-1</sup> ; 1800-900 cm <sup>-1</sup> )	AdaBoost	0.46	0.38	0.54
		<b>Artificial Neural Networks</b>	<b>0.73</b>	<b>0.77</b>	<b>0.70</b>
		Random Forest	0.42	0.38	0.46
		Support Vector Machine	0.57	0.46	0.69

As a way to identify which features have a stronger influence or predictive power on the analysis, we evaluated spectral feature scores to explain machine learning models. The score value of each feature within the AdaBoost and Artificial Neural Networks model helps to select which feature is important and which bands could be responsible for discrimination by the best algorithm to discriminate diabetic-retinopathy patients. By using the SHAP (Shapley Additive Explanations) tool to evaluate the importance of each feature within the best models, we can effectively identify which features are important and which spectral wavenumbers play a key role in discriminating diabetic-retinopathy patients using the most optimal algorithm. As an outcome, the main wavenumbers that have feature importance suggest discriminating non-

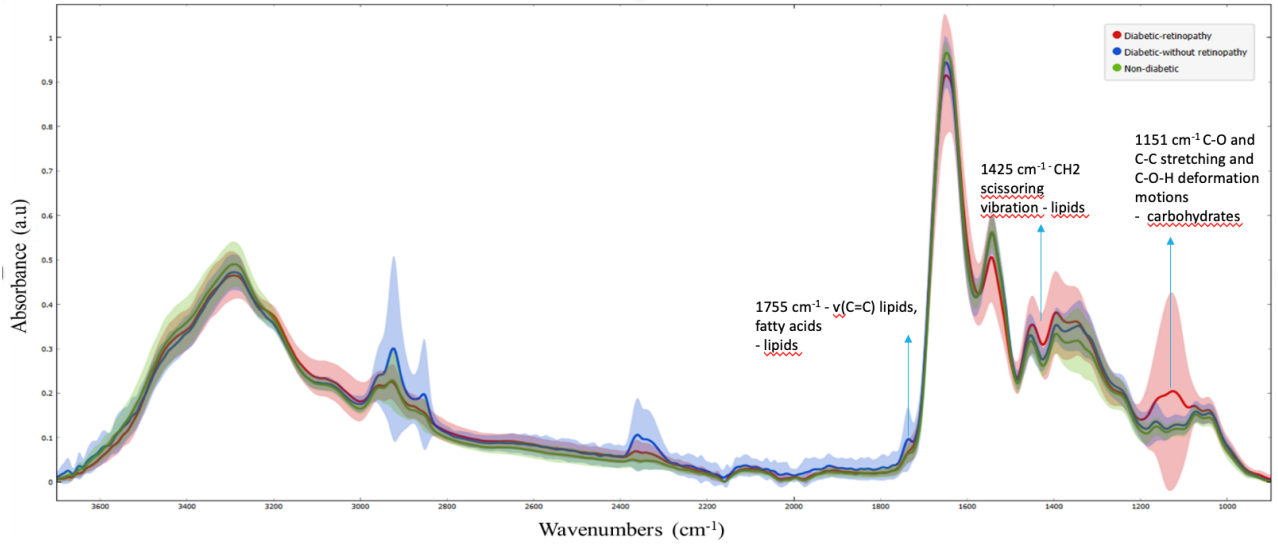
diabetics (ND) from diabetic\_retinopathy (DR) patients were 1151  $\text{cm}^{-1}$ , 1425  $\text{cm}^{-1}$ , 993  $\text{cm}^{-1}$ , 1755  $\text{cm}^{-1}$ , 1287  $\text{cm}^{-1}$ , 1725  $\text{cm}^{-1}$ , 2970  $\text{cm}^{-1}$ , 2989  $\text{cm}^{-1}$ , 1129  $\text{cm}^{-1}$ , and 1088  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 2). In addition, the SHAP value suggests discriminating the main tear wavenumbers at 1256  $\text{cm}^{-1}$ , 1647  $\text{cm}^{-1}$ , 2899  $\text{cm}^{-1}$ , 1414  $\text{cm}^{-1}$ , 2879  $\text{cm}^{-1}$ , 1075  $\text{cm}^{-1}$ , 1179  $\text{cm}^{-1}$ , 929  $\text{cm}^{-1}$ , 916  $\text{cm}^{-1}$ , and 903  $\text{cm}^{-1}$  as responsible for distinguishing diabetic without retinopathy (D) individuals and diabetic-retinopathy (DR) patients (Figure 3). The molecular assignments of each vibrational mode indicated by the score feature analysis from AdaBoost and Artificial Neural Networks are described in Table 3.



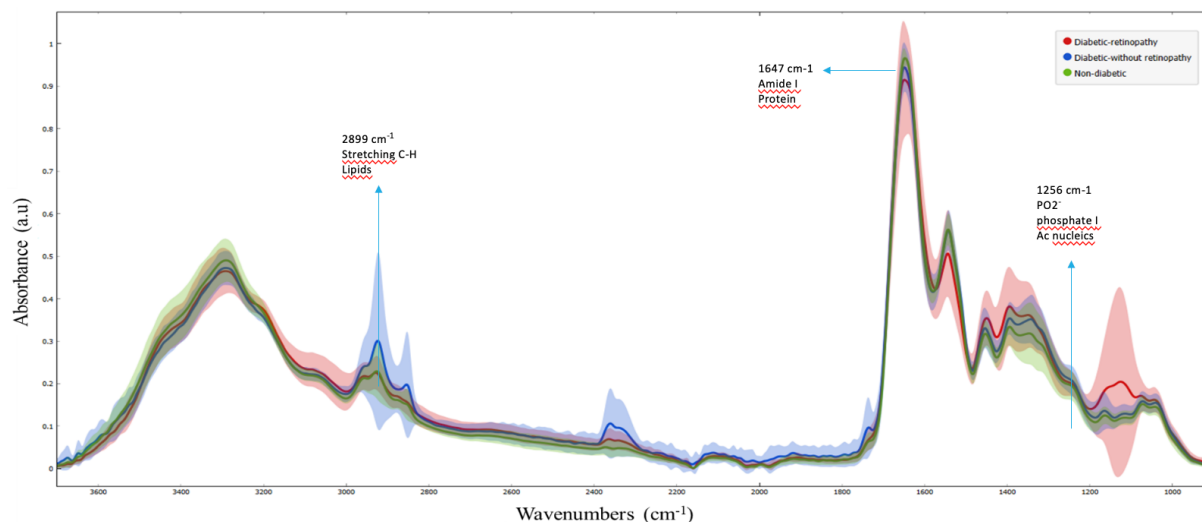
**Figure 2.** The feature importance (SHAP value) graph of the AdaBoost model to discriminate non diabetics (ND) from diabetic-retinopathy (DR) patients



**Figure 3.** The feature importance (SHAP value) graph of the Artificial Neural Networks model to discriminate diabetic without retinopathy (D) individuals and diabetic-retinopathy (DR) patients



**Figure 4.** Diabetic retinopathy versus non-diabetic retinopathy groups: graphical representation of the average ATR-FTIR spectrum, highlighting the 3 most important wave numbers.



**Figure 5.** Diabetic retinopathy versus diabetic groups: graphical representation of the average ATR-FTIR spectrum, highlighting the 3 most important wave numbers.

**Table 3.** Vibrational modes and biomolecular components of the most important spectral wavenumbers by AdaBoost and Artificial Neural Networks model in discriminating diabetic-retinopathy patients [11]

	Wavenumber	Vibrational mode	Biomolecular Components
<b>AdaBoost (ND x DR)</b>	1151 cm <sup>-1</sup>	C-O and C-C stretching and C-O-H deformation motions	Carbohydrates
	1425 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> scissoring vibration	Lipids
	993 cm <sup>-1</sup>	C- ribose, C-C	Carbohydrates
	1755 cm <sup>-1</sup>	v(C=C) lipids, fatty acids	Lipids
	1287 cm <sup>-1</sup>	Deformation N-H	Protein
	1725 cm <sup>-1</sup>	C=O stretching band mode of the fatty acid ester	Lipids
	2970 cm <sup>-1</sup>	v <sub>as</sub> CH <sub>3</sub> , lipids, fatty acids	Lipids
	2989 cm <sup>-1</sup>	C-H ring	Lipids
	1129 cm <sup>-1</sup>	v(C-O), disaccharides	Carbohydrates
	1088 cm <sup>-1</sup>	Phosphate I (stretching PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> symmetric vibration)	Nucleic acids
<b>Artificial Neural Networks (D x DR)</b>	1256 cm <sup>-1</sup>	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asymmetric (phosphate I)	Nucleic acids
	1647 cm <sup>-1</sup>	Amide I	Protein
	2899 cm <sup>-1</sup>	Stretching C-H	Lipids
	1414 cm <sup>-1</sup>	Deformation C-H, N-H, stretching C-N	Proteins
	2879 cm <sup>-1</sup>	Stretching C-H	Lipids
	1075 cm <sup>-1</sup>	V(PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) symmetric stretching of phosphodiester	Nucleic acids
	1179 cm <sup>-1</sup>	Amide III	Protein
	929 cm <sup>-1</sup>	Left-handed helix DNA (Z form)	Nucleic acids
	916 cm <sup>-1</sup>	Phosphodiester region	Nucleic acids
	903 cm <sup>-1</sup>	Phosphodiester region	Nucleic acids

### 3. Discussion

To bring understanding and applicability of the classification into the health science field, we used regions of the spectrum that correspond to areas of biological interest (3050-2800  $\text{cm}^{-1}$  along with 1800-900  $\text{cm}^{-1}$ ) in a classification process using machine learning algorithms. After pre-processing the raw spectra and applying normalization and baseline correction methods, in addition to machine learning strategies, was possible differentiation between the groups of non-diabetic subjects (ND) compared to the group with diabetic retinopathy (DR), with an accuracy of 0.73, sensitivity of 0.70 and specificity of 0.76; using the AdaBoost algorithm. The three main spectral bands that stood out most in differentiating ND from DR groups were: 1151 $\text{cm}^{-1}$  (C-O and C-C stretching and C-O-H deformation motions), 1425  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> scissoring vibration) and 993  $\text{cm}^{-1}$  (C-ribose, C-C). Among the corresponding biomolecular components, respectively, we find carbohydrates and lipids. Between the groups D and DR, the Artificial Neural Networks algorithm obtained an accuracy of 0.73, sensitivity of 0.77 and specificity of 0.70. The three main spectral bands that stood out most in differentiating D from DR groups were 1256  $\text{cm}^{-1}$  (asymmetric PO<sub>2</sub> - phosphate I bonds), 1647 $\text{cm}^{-1}$  (amide I) and 2899  $\text{cm}^{-1}$  (C-H stretching). The corresponding biomolecular components were nucleic acids, proteins and lipids. The results point to the possible application of this test as a form of screening of people with diabetic retinopathy, using tear samples, in a non-invasive way, relatively easy to collect and low cost-effectiveness.

To date, most studies of DR biomarkers have focused on assessing aqueous humor, including inflammatory cytokines and chemokines [16], while others examined the vitreous, and plasma [17] while few studies using FTIR applied to diabetic retinopathy have been described in the scientific literature to date.

One study evaluated the glycation process in nail samples from subjects with diabetic retinopathy compared to healthy subjects, using ATR-FTIR and Nanodop spectrometer, with an emphasis on the fructosamine, a short-term (2- to 3-wk) marker of disease status in patients. The results of this study showed that the uptake of glycated protein in the nails was lower in the control group compared to patients with DM and DR, illustrating that excess carbohydrates were distinguished by recombinant fructosamine 3 kinase [6]. This study was based on the results of Fahar et al. (20) who used FTIR and amide peaks in the nails of diabetics and healthy people, and observed that the healthy people had lower amide peaks. In our study, we found that the 1647 $\text{cm}^{-1}$  amide I peak was the second most important in discriminating between group D and group RD.

Caixeta et al. in 2023, using saliva samples applied to ATR-FTIR, to discriminate diabetics from controls without diabetes, showed that when using the 1073  $\text{cm}^{-1}$  band (carbohydrates and glycosylated proteins); the test was able to separate the groups with a sensitivity of 95.6%, and using the 2962  $\text{cm}^{-1}$  band (asymmetric stretching vibration of CH<sub>3</sub> of lipids) with a specificity of 100%. [12]. These findings are consistent with the pathophysiology of DM, with an increase in lipids due to increased lipolysis in adipocytes due to poor insulinization, resulting in increased release of fatty acids from adipocytes. In our study, among the main



vibrational modes when analyzing the ND vs. DR groups were lipids, which were more evident in the diabetic retinopathy group.

The most recent guidelines for DR screening were released by the International Council of Ophthalmology (ICO) and American Diabetes Association (ADA) in 2018 [18]. Dilated fundus exam performed by an ophthalmologist is considered the gold standard method for diagnosing DR and monitoring patients at risk of developing DR; however, a yearly exam in a resourced-limited setting would prove unfeasible given the growing gap in access to eye care professionals [19]. Tele-retina has been proposed as a cost-effective alternative to examination by an ophthalmologist, whereby retinal images taken at one site are transmitted to and interpreted at another site. Retinal photography, in addition to a visual acuity test with refraction, can satisfy the recommended screening criteria set forth by the ICO/ADA and AAO [20]. A dilated fundus examination performed by an ophthalmologist showed a sensitivity of 84-92% and a specificity of 92-98% and non-mydriatic photography demonstrated a sensitivity of 78-98% and a specificity of 86-90% in identifying diabetic retinopathy [21]. In our study, we found lower levels of test accuracy compared to the gold standard test.

A limitation of the applicability of tear analysis by ATR-FTIR would be the dependence on a trained professional to collect the tear and the relative discomfort of the collection technique, which requires some manual dexterity. Improvements in the tear sample collection process are important. Variations in the total collection time between one participant and another, due to the idiosyncrasies of each subject, in terms of tear volume produced and also their own cooperation with the collection, deserve to be taken into account in the final result. An alternative would be to research and verify a collection protocol using tape paper (Schirmer's test) [22], which would make the collection less uncomfortable for the subject. However, this would require a more complex preparation of the samples, which would be time-consuming and require various chemical reagents [23]. The metrics demonstrated by the test, after applying artificial intelligence algorithms, were of reasonable value and acceptability. More accurate logistics for storing and transporting the samples to an FTIR analysis laboratory should be planned. Or, alternatively, the availability of a portable spectroscopy device that can reach the location of the target population. The professional who will carry out the analysis must be trained and specific knowledge is needed to apply artificial intelligence algorithms, but the learning curve must not be too long.

This is, to our current knowledge, the first study involving diabetic retinopathy tears using ATR-FTIR combined with artificial intelligence analyses. The results of this study highlight the possibility to discriminate diabetic subjects, between those with diabetic retinopathy and those without diabetic retinopathy; using tear samples applied to ATR-FTIR, as a non-invasive, fast, reagent-free and easy-to-do analyses in remote locations, as a point-of-care.

## 4. Materials and Methods

### 4.1 Ethical aspects

This cross-sectional, non-interventional study was carried out at the Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil). All experimental procedures were carried out in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and were approved by the Research Ethics Council of the Federal University of Uberlândia, under CAAE number 49970221.5.0000.5152. Written informed consent was obtained from all the participants in this study.

### 4.2 The study subjects:

Adult individuals living in the city of Uberlândia-MG and the surrounding region, over 18 years of age, of both sexes, who agreed to take part in the study. Most were patients of the endocrinology and/or ophthalmology outpatient clinics at HC-UFU. Some others were known healthy employees of the biochemistry and molecular biology laboratory or the ophthalmology department at the university.

Participants with a recent history of eye surgery, trauma, use of topical glaucoma medication or other topical ophthalmic medication, application of intravitreal medication for less than 6 months, current contact lens use, pregnancy or lactation were excluded.

At the discretion of the examiner, participants with any other specific condition that could interfere with the results of the tear biochemical pattern were excluded.

### 4.3 Subdivision of groups

- **Non-diabetics (ND):** absence of diabetes reported by the participant;
- **Diabetics (D):** diagnosed with diabetes using criteria established by the World Health Organization, such as fasting glycemia  $\geq 126$ mg/dl or aleatory glycemia  $> 200$ mg/dl or glycemia after 2 hours of oral glucose tolerance test  $\geq 200$ mg/dl or HbA1C  $\geq 6.5\%$ . (13). To verify the absence of retinopathy, an indirect ophthalmoscopy (retinal mapping) examination was carried out as described below.
- **Diabetic retinopathy (DR):** diabetics diagnosed with diabetic retinopathy, according to a recent indirect ophthalmoscopy examination under mydriasis. For this purpose, 1 drop of tropicamide and 1 drop of phenylephrine were used in each eye, 3 times with an interval of around 5 minutes. The examination was carried out by a trained ophthalmologist with expertise in retinal and vitreous diseases. This test was carried out on the same day, but after the tear collection, so that the mydriatic drugs would not interfere with the biochemistry of the sample. Retrospectively, the retinopathy was classified and the participant allocated to a group according to the result of the indirect retinal mapping ophthalmoscopy.

### 4.4 Classification of diabetic retinopathy

The classification of diabetic retinopathy severity was based on the criteria defined by the International Clinical Diabetic Retinopathy Severity Scale (ICDR), which modified the ETDRS (Early Treatment

Diabetic Retinopathy Study) classification in 2002. The classes were: no apparent retinopathy; mild non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR); moderate NPDR; severe NPDR; proliferative diabetic retinopathy (PDR) [24].

#### ***4.5 Sample collection, transportation and storage:***

Tear samples were collected using heparin-free glass micro-capillary tubes (inner diameter 1.1 to 1.2 mm; outer diameter 1.5 mm to 1.6 mm; length 75 mm) in contact with the lateral or medial corner of the palpebral fissure, looking for the lacrimal meniscus, preferably without touching the ocular surface. Beforehand, a drop of distilled water from a freshly opened 10ml sterile flacon was instilled to increase the volume of the sample, in order to facilitate collection, since in the pilot tests, some participants found it difficult to collect enough volume if they tried to collect the tear without adding distilled water. The participant was instructed to blink three times after instilling the drop of distilled water, before the collection procedure began. After filling the microcapillary tube with the tear, it was expelled through a small pipette attached to a 5-microliter tip at the opposite end of the microcapillary tube where the sample was not present, into a 200 microliter Eppendorf plastic tube. The tubes were sealed and immediately stored in an expanded polystyrene thermal box with water ice, which was purchased early in the morning from an ice machine in the nano biotechnology laboratory. At the end of the collection period, this box was transported from the central outpatient clinic at HC-UFU to the nano biotechnology laboratory at UFU for storage in an ultra-freezer at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### ***4.6 ATR-FTIR samples spectroscopy:***

Tear spectra were taken at  $4000\text{-}650\text{cm}^{-1}$  on a Cary 630 FTIR spectrophotometer (Agilent Technologies, Mulgrave, VIC, Australia) coupled to the attenuated total reflectance (ATR) component. The tear ( $2\mu\text{L}$ ) was dried directly at room temperature on an ATR crystal for 8 minutes and then the spectra were recorded. Before each analysis, the air spectrum was used as a background. The spectra were obtained in a room with a temperature of around  $22\text{-}23^{\circ}\text{C}$ ,  $2\text{ cm}^{-1}$  resolution, and 64 scans were taken.

#### ***4.7 Pre-processing and evaluation of spectral data by machine learning algorithms:***

The spectra were processed using Orange 3.3.5 software (Bioinformatics Lab at University of Ljubljana, Slovenia). The spectra were normalized and the baseline was corrected to avoid errors during the execution of the spectral analyses in the equipment, then the average of the spectra was performed.

The analysis of the infrared spectral data involved two main phases: preprocessing and classification. Preprocessing included steps such as data aggregation, attribute selection, and data transformation. Spectral readings from each sample were aggregated, and the data were then truncated on the lipidic region ( $3050\text{ - }2800\text{ cm}^{-1}$ ) and the biofingerprint region ( $1800\text{ - }900\text{ cm}^{-1}$ ). Attribute selection was performed using both Raw data and Rubberband + Min-Max methods.

For classification, advanced machine learning techniques were applied. AdaBoost, Artificial Neural Networks, Random Forest, and Support Vector Machine algorithms were chosen based on their superior performance during model training. To evaluate the predictive performance of these algorithms, leave-one-out was employed. The assessment of results relied on three well-established performance metrics from the literature: sensitivity, specificity, and accuracy.

#### *4.8 Statistical analysis*

For statistical analyzes of demographic data and comparisons pertinent to diabetic retinopathy of the studied sample, we used the Jamovi software (version 2.3.28.0). Firstly, a descriptive statistics strategy was used to calculate the means, medians, standard deviation, minimum and maximum and, when relevant, percentage of each variable (Table 1). The Shapiro-Wilk test was applied to test the normality of sampling distribution. Chi-square tests on independent samples were used to compare the groups and the respective variables.

### **5. Conclusions**

The results of the study indicate that tear analysis using ATR-FTIR could be a new field of study for diabetic retinopathy, especially in terms of discriminating the spectral profile between subjects with diabetic retinopathy. The metrics of accuracy 0.73, sensitivity 0.77, specificity 0.70; obtained were reasonably satisfactory in differentiating people with diabetic retinopathy from diabetics without retinopathy. An alternative way of screening for diabetic retinopathy in remote places where an eye care professional may not be present was investigated in this study.

**Author Contributions:** Tadashi Ono Junior: selection of volunteers, outpatient care, acquisition and storage of biological samples, data curation, formal analysis, writing—original draft; Douglas Carvalho Caixeta: ATR-FTIR acquisition date; data analysis and data curation; Robinson Sabino Silva: conceptualization, data analysis, data curation, validation, writing – review & editing; Foued Salmen Espindola: conceptualization, formal analysis, writing – review & editing, advisor and supervision.

**Funding:** This research was funded by the National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (INCT—TeraNano, grants # CNPq/CAPES/FAPEMIG, CNPq-465669/2014-0 and FAPEMIG-CBB-APQ-03613-17, <https://www.teranano.ufu.br>). DCC received post-doctoral fellowship from CNPq. RSS and FSE received scholarship from CNPq.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Uberlândia under protocol CAAE number 49970221.5.0000.5152.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data will be made available on request.

**Acknowledgments:** This research acknowledges the administrative and technical support of the Clinics' Hospital of the Federal University of Uberlandia (HC-UFU, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

1. International Diabetes Federation *IDF Diabetes Atlas*; 10th ed.; IDF: Brussels, 2021;
2. Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes* **2005**, *54*, 1615–1625, doi:10.2337/diabetes.54.6.1615.
3. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): Results of Feasibility Study. The DCCT Research Group. *Diabetes Care* **1987**, *10*, 1–19, doi:10.2337/diacare.10.1.1.
4. Stratton, I.M. Association of Glycaemia with Macrovascular and Microvascular Complications of Type 2 Diabetes (UKPDS 35): Prospective Observational Study. *BMJ* **2000**, *321*, 405–412, doi:10.1136/bmj.321.7258.405.
5. *Retina*; Ryan, S.J., Ed.; 5th ed.; Saunders/Elsevier: London, 2013; ISBN 978-1-4557-0737-9.
6. Jurgeleviciene, L.; Stanislovaitiene, D.; Tatarunas, V.; Jurgelevicius, M.; Zaliuniene, D. Assessment of Absorption of Glycated Nail Proteins in Patients with Diabetes Mellitus and Diabetic Retinopathy. *Medicina* **2020**, *56*, 658, doi:10.3390/medicina56120658.
7. Yau, J.W.Y.; Rogers, S.L.; Kawasaki, R.; Lamoureux, E.L.; Kowalski, J.W.; Bek, T.; Chen, S.-J.; Dekker, J.M.; Fletcher, A.; Grauslund, J.; et al. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 556–564, doi:10.2337/dc11-1909.
8. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmology* **2021**, *128*, 1580–1591, doi:10.1016/j.ophtha.2021.04.027.
9. Pflugfelder, S.C.; Stern, M.E. Biological Functions of Tear Film. *Experimental Eye Research* **2020**, *197*, 108115, doi:10.1016/j.exer.2020.108115.
10. Green-Church, K.B.; Butovich, I.; Willcox, M.; Borchman, D.; Paulsen, F.; Barabino, S.; Glasgow, B.J. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Tear Film Lipids and Lipid-Protein Interactions in Health and Disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 1979, doi:10.1167/iovs.10-6997d.
11. Talari, A.C.S.; Martinez, M.A.G.; Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I.U. Advances in Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* **2017**, *52*, 456–506, doi:10.1080/05704928.2016.1230863.
12. Caixeta, D.C.; Carneiro, M.G.; Rodrigues, R.; Alves, D.C.T.; Goulart, L.R.; Cunha, T.M.; Espindola, F.S.; Vitorino, R.; Sabino-Silva, R. Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diagnostics* **2023**, *13*, 1396, doi:10.3390/diagnostics13081396.
13. Caixeta, D.C.; Aguiar, E.M.G.; Cardoso-Sousa, L.; Coelho, L.M.D.; Oliveira, S.W.; Espindola, F.S.; Raniero, L.; Crosara, K.T.B.; Baker, M.J.; Siqueira, W.L.; et al. Salivary Molecular Spectroscopy: A Sustainable, Rapid and Non-Invasive Monitoring Tool for Diabetes Mellitus during Insulin Treatment. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0223461, doi:10.1371/journal.pone.0223461.
14. Ferreira, I.C.C.; Aguiar, E.M.G.; Silva, A.T.F.; Santos, L.L.D.; Cardoso-Sousa, L.; Araújo, T.G.; Santos, D.W.; Goulart, L.R.; Sabino-Silva, R.; Maia, Y.C.P. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *Journal of Oncology* **2020**, *2020*, 1–11, doi:10.1155/2020/4343590.
15. Travo, A.; Paya, C.; Délérís, G.; Colin, J.; Mortemousque, B.; Forfar, I. Potential of FTIR Spectroscopy for Analysis of Tears for Diagnosis Purposes. *Anal Bioanal Chem* **2014**, *406*, 2367–2376, doi:10.1007/s00216-013-7607-5.
16. Rusnak, S.; Vrzalova, J.; Sobotova, M.; Hecova, L.; Ricarova, R.; Topolcan, O. The Measurement of Intraocular Biomarkers in Various Stages of Proliferative Diabetic Retinopathy Using Multiplex xMAP Technology. *Journal of Ophthalmology* **2015**, *2015*, 1–6, doi:10.1155/2015/424783.
17. Jin, J.; Min, H.; Kim, S.J.; Oh, S.; Kim, K.; Yu, H.G.; Park, T.; Kim, Y. Development of Diagnostic Biomarkers for Detecting Diabetic Retinopathy at Early Stages Using Quantitative Proteomics. *Journal of Diabetes Research* **2016**, *2016*, 1–22, doi:10.1155/2016/6571976.
18. Wong, T.Y.; Sun, J.; Kawasaki, R.; Ruamviboonsuk, P.; Gupta, N.; Lansingh, V.C.; Maia, M.; Mathenge, W.; Moreker, S.; Muqit, M.M.K.; et al. Guidelines on Diabetic Eye Care. *Ophthalmology* **2018**, *125*, 1608–1622, doi:10.1016/j.ophtha.2018.04.007.

19. Resnikoff, S.; Felch, W.; Gauthier, T.-M.; Spivey, B. The Number of Ophthalmologists in Practice and Training Worldwide: A Growing Gap despite More than 200 000 Practitioners. *Br J Ophthalmol* **2012**, *96*, 783–787, doi:10.1136/bjophthalmol-2011-301378.
20. Avidor, D.; Loewenstein, A.; Waisbourd, M.; Nutman, A. Cost-Effectiveness of Diabetic Retinopathy Screening Programs Using Telemedicine: A Systematic Review. *Cost Eff Resour Alloc* **2020**, *18*, 16, doi:10.1186/s12962-020-00211-1.
21. Ting, D.S.W.; Cheung, G.C.M.; Wong, T.Y. Diabetic Retinopathy: Global Prevalence, Major Risk Factors, Screening Practices and Public Health Challenges: A Review: Global Burden of Diabetic Eye Diseases. *Clinical & Experimental Ophthalmology* **2016**, *44*, 260–277, doi:10.1111/ceo.12696.
22. Khanna, R.K.; Catanese, S.; Emond, P.; Corcia, P.; Blasco, H.; Pisella, P.-J. Metabolomics and Lipidomics Approaches in Human Tears: A Systematic Review. *Survey of Ophthalmology* **2022**, *67*, 1229–1243, doi:10.1016/j.survophthal.2022.01.010.
23. Amorim et al. - 2022 - Putative Biomarkers in Tears for Diabetic Retinopa.Pdf.
24. Yang, Z.; Tan, T.-E.; Shao, Y.; Wong, T.Y.; Li, X. Classification of Diabetic Retinopathy: Past, Present and Future. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 1079217, doi:10.3389/fendo.2022.1079217.

## REFERÊNCIAS

- AKAGI, Y. *et al.* Aldose reductase localization in human retinal mural cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 1516–1519, 1983.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 41, n. Supplement\_1, p. S13–S27, 2017. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>
- AMORIM, Madania *et al.* Putative Biomarkers in Tears for Diabetic Retinopathy Diagnosis. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 9, p. 873483, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.873483>
- AVIDOR, Daniel *et al.* Cost-effectiveness of diabetic retinopathy screening programs using telemedicine: a systematic review. **Cost Effectiveness and Resource Allocation**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 16, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12962-020-00211-1>
- BROWNLEE, Michael. The Pathobiology of Diabetic Complications. **Diabetes**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
- BYAMBAJAV, Mungunshur *et al.* Tear Fluid Biomarkers and Quality of Life in People with Type 2 Diabetes and Dry Eye Disease. **Metabolites**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 733, 2023. <https://doi.org/10.3390/metabo13060733>
- CAIXETA, Douglas Carvalho *et al.* Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. **Diagnostics**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1396, 2023. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081396>
- CHASAN, Joel E. *et al.* Effect of a Teleretinal Screening Program on Eye Care Use and Resources. **JAMA Ophthalmology**, [s. l.], v. 132, n. 9, p. 1045, 2014. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.1051>
- CHEN, Liyan *et al.* Characterization of The Human Tear Metabolome by LC–MS/MS. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 4876–4882, 2011. <https://doi.org/10.1021/pr2004874>
- COGAN, David G. Retinal Vascular Patterns: IV. Diabetic Retinopathy. **Archives of Ophthalmology**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 366, 1961. <https://doi.org/10.1001/archophth.1961.00960010368014>
- DAS, Taraprasad *et al.* Recently updated global diabetic retinopathy screening guidelines: commonalities, differences, and future possibilities. **Eye**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 2685–2698, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41433-021-01572-4>
- DUTTA, Aastha. Chapter 4 - Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *In*: THOMAS, Sabu *et al.* (org.). **Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization**. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 73–93. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>

FLAXEL, Christina J. *et al.* Diabetic Retinopathy Preferred Practice Pattern®. **Ophthalmology**, [s. l.], v. 127, n. 1, p. P66–P145, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.09.025>

FRIBERG, Thomas R; PANDYA, Angana; ELLER, Andrew W. Non-Mydriatic Panoramic Fundus Imaging Using a Non-Contact Scanning Laser-Based System. **Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 488–497, 2003. <https://doi.org/10.3928/1542-8877-20031101-15>

GREEN-CHURCH, Kari B. *et al.* The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Tear Film Lipids and Lipid–Protein Interactions in Health and Disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 1979, 2011. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6997d>

HAGAN, Suzanne; MARTIN, Eilidh; ENRÍQUEZ-DE-SALAMANCA, Amalia. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. **EPMA Journal**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 15, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13167-016-0065-3>

JORGENSEN, Rachel. Self-Monitoring of Blood Glucose: A Reply. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 134–135, 1987. <https://doi.org/10.2337/diacare.10.1.134c>

KAŠTELAN, Snježana *et al.* The Influence of Tear Film Quality on Visual Function. **Vision**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 8, 2024. <https://doi.org/10.3390/vision8010008>

KHAN, Moien Abdul Basith *et al.* Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends:. **Journal of Epidemiology and Global Health**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 107, 2019. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191028.001>

KHANNA, Raoul K *et al.* Metabolomics and lipidomics approaches in human tears: A systematic review. **Survey of Ophthalmology**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 1229–1243, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2022.01.010>

KLEIN, Ronald *et al.* The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. **Ophthalmology**, [s. l.], v. 91, n. 12, p. 1464–1474, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(84\)34102-1](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(84)34102-1)

KUWABARA, Toichiro. Studies of Retinal Vascular Patterns: Part I. Normal Architecture. **Archives of Ophthalmology**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 904, 1960. <https://doi.org/10.1001/archophth.1960.01840010906012>

LINDAHL, Per *et al.* Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice. **Science**, [s. l.], v. 277, n. 5323, p. 242–245, 1997. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.242>

MAGLIANO, Dianna; BOYKO, Edward J. **IDF diabetes atlas**. 10th editioned. Brussels: International Diabetes Federation, 2021. <https://www.diabetesatlas.org>



NEUBAUER, Aljoscha S. *et al.* Nonmydriatic screening for diabetic retinopathy by ultra-widefield scanning laser ophthalmoscopy (Optomap). **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, [s. l.], v. 246, n. 2, p. 229–235, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00417-007-0631-4>

NØRGAARD, Mads Fonager; GRAUSLUND, Jakob. Automated Screening for Diabetic Retinopathy – A Systematic Review. **Ophthalmic Research**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 9–17, 2018. <https://doi.org/10.1159/000486284>

PARKER, Emily D. *et al.* Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2022. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 26–43, 2024. <https://doi.org/10.1159/000486284>

PETERSEN, Max C.; SHULMAN, Gerald I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 2133–2223, 2018. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

PFLUGFELDER, Stephen C.; STERN, Michael E. Biological functions of tear film. **Experimental Eye Research**, [s. l.], v. 197, p. 108115, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108115>

QUATTRIN, Teresa; MASTRANDREA, Lucy D; WALKER, Lucy S K. Type 1 diabetes. **The Lancet**, [s. l.], v. 401, n. 10394, p. 2149–2162, 2023. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00223-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00223-4)

RANTAMÄKI, Antti H. *et al.* Human Tear Fluid Lipidome: From Composition to Function. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. e19553, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019553>

RESNIKOFF, Serge *et al.* The number of ophthalmologists in practice and training worldwide: a growing gap despite more than 200 000 practitioners. **British Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 96, n. 6, p. 783–787, 2012. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2011-301378>

RYAN, Stephen J. (org.). **Retina**. 5th ed. London: Saunders/Elsevier, 2013.

SHIMOMURA, Hiroyuki; SPIRO, Robert G. Studies on Macromolecular Components of Human Glomerular Basement Membrane and Alterations in Diabetes: Decreased Levels of Heparan Sulfate Proteoglycan and Laminin. **Diabetes**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 374–381, 1987. <https://doi.org/10.2337/diabetes.36.3.374>

SPIRO, Robert G; SPIRO, Mary Jane. Effect of Diabetes on the Biosynthesis of the Renal Glomerular Basement Membrane: Studies on the Glucosyltransferase. **Diabetes**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 641–648, 1971. <https://doi.org/10.2337/diab.20.10.641>

STRATTON, I. M. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ**, [s. l.], v. 321, n. 7258, p. 405–412, 2000. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.405>

TALARI, Abdullah Chandra Sekhar *et al.* Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 456–506, 2017. <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1230863>

TING, Daniel Shu Wei; CHEUNG, Gemmy Chui Ming; WONG, Tien Yin. Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review: Global burden of diabetic eye diseases. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 260–277, 2016. <https://doi.org/10.1111/ceo.12696>

TRAVO, Adrian *et al.* Potential of FTIR spectroscopy for analysis of tears for diagnosis purposes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 406, n. 9–10, p. 2367–2376, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7607-5>

TUTT, Ron *et al.* Optical and Visual Impact of Tear Break-up in Human Eyes. [s. l.], v. 41, n. 13, 2000.

WONG, Tien Y. *et al.* Guidelines on Diabetic Eye Care. **Ophthalmology**, [s. l.], v. 125, n. 10, p. 1608–1622, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.04.007>

WONG, Tien Yin; TAN, Tien-En. The Diabetic Retinopathy “Pandemic” and Evolving Global Strategies: The 2023 Friedenwald Lecture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [s. l.], v. 64, n. 15, p. 47, 2023. <https://doi.org/10.1167/iovs.64.15.47>

XIAO, Yuanyuan *et al.* Assessment of early diabetic retinopathy severity using ultra-widefield Clarus versus conventional five-field and ultra-widefield Optos fundus imaging. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 17131, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43947-5>

YANG, Zhengwei *et al.* Classification of diabetic retinopathy: Past, present and future. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 13, p. 1079217, 2022. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1079217>

YAU, Joanne W. Y. *et al.* Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 556–564, 2012. <https://doi.org/10.2337/dc11-1909>

ZHOU, Lei *et al.* In-depth analysis of the human tear proteome. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 75, n. 13, p. 3877–3885, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.053>