



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANDRÉ FILIPE SANTOS NUNES

***Caracterização estrutural e funcional dos efeitos do
tratamento com hidroxicloroquina na retina***

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE OFTALMOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
ISABEL ALEXANDRA DE SOUSA PIRES
PEDRO NUNO BEIRÃO CARDOSO QUADRADO GIL

JANEIRO/2018

Resumo

Introdução: A retinopatia por hidroxicloroquina é uma complicação reconhecida do tratamento prolongado com este fármaco, podendo conduzir a perda visual irreversível, sendo essencial a detecção precoce da toxicidade. Este estudo teve como objetivo a avaliação da influência do tratamento com hidroxicloroquina no campo visual central e na espessura das camadas retinianas obtida após segmentação com o *spectral-domain optical coherence tomography* (SD-OCT).

Métodos: Estudo retrospectivo transversal. Foram incluídos doentes referenciados para rastreamento de retinotoxicidade da hidroxicloroquina e excluídos doentes com glaucoma ou patologia da retina. Todos os doentes foram submetidos a avaliação oftalmológica completa, SD-OCT e perimetria computadorizada dos 10° centrais. Efetuou-se segmentação automática dos *scans* de SD-OCT de forma a obter a espessura de cada camada da retina. O complexo de células ganglionares resultou da combinação das camadas de fibras nervosas, células ganglionares e plexiforme interna. Os doentes foram divididos em dois grupos, um que incluiu os doentes com menos de 5 anos de tratamento (Grupo A) e outro com os doentes com pelo menos 5 anos de tratamento (Grupo B), representando, respetivamente, os efeitos de curto e longo-prazo do tratamento com hidroxicloroquina.

Resultados: Foram incluídos neste estudo 179 olhos de 93 doentes (Grupo A: 49 olhos; Grupo B: 130 olhos), com idade média de $55,87 \pm 12,92$ anos e predominância do sexo feminino (84,92%). A duração média do tratamento foi de $8,36 \pm 5,11$ anos, com uma dose diária por peso corporal real de $5,07 \pm 1,54$ mg/kg, totalizando uma dose cumulativa de $1014,78 \pm 675,93$ gramas de hidroxicloroquina. Os grupos eram semelhantes no que concerne à idade e sexo ($p > 0,05$). A espessura total da retina foi significativamente menor no grupo B relativamente ao grupo A ($314,46 \pm 16,30$ contra $308,44 \pm 13,71$; $p = 0,014$). No

grupo B, os setores parafoveais do complexo de células ganglionares apresentaram correlação inversa significativa com a dose cumulativa total ($r=-0,32$; $p<0,001$). Ajustando para a idade ($\beta=-0,111$; $p=0,267$), sexo feminino ($\beta=-0,259$; $p=0,006$) e equivalente esférico ($\beta=0,245$; $p=0,014$), a espessura parafoveal do complexo de células ganglionares diminuiu $0,004 \mu\text{m}$ por cada grama de aumento na dose cumulativa de hidroxicloroquina ($R\text{-quadrado} = 15,73\%$). A espessura da retina externa parafoveal, assim como os índices sumários dos campos visuais, foram semelhantes entre os grupos e não apresentaram correlação com a dose cumulativa.

Conclusão: Doses cumulativas crescentes de hidroxicloroquina podem induzir diminuição progressiva da espessura da retina interna parafoveal, particularmente do complexo de células ganglionares. Os índices sumários dos campos visuais não refletiram, neste estudo, os efeitos de longo-prazo da hidroxicloroquina.

Palavras-chave: Hidroxicloroquina; Toxicidade; Degeneração Macular; Retinopatia.

Abstract

Introduction: Hydroxychloroquine retinopathy is a recognized complication of the prolonged treatment with this drug, leading to irreversible visual loss, being essential the early detection of toxicity. The purpose of this study was to evaluate the influence of the treatment with hydroxychloroquine on the central visual field and on the retinal layers thickness after segmentation with spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT).

Methods: Retrospective, cross sectional study. The patients referred for hydroxychloroquine retinopathy screening were included and patients with glaucoma or retinal diseases were excluded. All patients underwent a complete ophthalmological examination, SD-OCT and central visual field testing. Automatic segmentation was performed using the SD-OCT *software*, so that the thickness of each retinal layer was obtained. The ganglion cell complex was obtained by the combination of the nerve fiber, inner plexiform and ganglion cell layers. Patients were divided in two groups, one including patients with less than 5 years of treatment (Group A) and other including patients with at least 5 years of treatment with hydroxychloroquine (Group B), representing, respectively, the short and long-term effects of the treatment.

Results: In this study, 179 eyes from 93 patients were included (Group A: 49 eyes; Group B: 130 eyes), with a median age of $55,87 \pm 12,92$ years and female sex predominance (84,92%). The median duration of treatment was $8,36 \pm 5,11$ years, with a daily dose by real body weight of $5,07 \pm 1,54$ mg/kg, totaling a cumulative dose of $1014,78 \pm 675,93$ g of hydroxychloroquine. Both groups were similar regarding age and sex ($p > 0,05$). Total retinal thickness was significantly thinner in group B comparing to group A ($314,46 \pm 16,30$ vs. $308,44 \pm 13,71$; $p = 0,014$). In group B, the inner sectors of the ganglion

cell complex showed a significant inverse correlation with total cumulative dose ($r=-0,32$; $p<0,001$). After adjusting for age ($\beta=-0,111$; $p=0,267$), female sex ($\beta=-0,259$; $p=0,006$) and spherical equivalent ($\beta=0,245$; $p=0,014$), parafoveal thickness of the ganglion cell complex decreased $0,004 \mu\text{m}$ for each gram increase on the hydroxychloroquine cumulative dose (R-squared = 15,73%). The parafoveal outer retina, as well as the summary indices of the visual fields, were similar between groups and did not correlate with cumulative dose.

Conclusion: Increasing cumulative doses of hydroxychloroquine can induce progressive thinning of the parafoveal inner retina, particularly of the ganglion cell complex. In this study, the summary indices of the visual fields did not reflect the long-term effects of hydroxychloroquine.

Keywords: Hydroxychloroquine; Toxicity; Macular Degeneration; Retinopathy.

Índice

Introdução.....	2
Materiais e Métodos	4
Desenho do estudo.....	4
Seleção dos participantes.....	4
Colheita dos dados.....	5
Protocolo de exames complementares de diagnóstico	6
Análise dos dados	8
Resultados.....	10
Análise geral e caracterização da amostra.....	10
Análise de acordo com os grupos de estudo.....	12
Análise univariada e multivariada	15
Avaliação funcional.....	16
Discussão.....	17
Conclusão	23
Agradecimentos.....	24
Referências bibliográficas	25

Introdução

A hidroxicloroquina (HCQ) é um fármaco frequentemente usado em diversas patologias autoimunes, especialmente do foro reumatológico e dermatológico, como o lúpus eritematoso sistémico (LES) e a artrite reumatóide (AR), podendo ser usada como tratamento primário ou como terapêutica adjuvante.¹ Observa-se ainda atualmente o surgimento de novas aplicações em campos como a diabetes e dislipidémia, oncologia² e doenças inflamatórias pediátricas.¹ Considerando a diversidade de aplicações clínicas da HCQ, será fácil deduzir que o seu mecanismo de ação não se pode resumir a um processo único.² Alguns dos mecanismos propostos para a sua ação anti-inflamatória e imunomoduladora assentam na inibição do processamento e apresentação antigénica (através da inibição da acidificação lisossómica, entre outros mecanismos),² na inibição da produção de citocinas pelas células T e na interferência em vias de sinalização dependentes do cálcio em células T e B.³

Apesar de ser um fármaco geralmente bem tolerado e de ter um perfil de segurança sistémica muito favorável, a HCQ pode apresentar toxicidade retiniana, associando-se a perda visual irreversível, potencialmente progressiva após suspensão do fármaco.⁴ Esta progressão poderá dever-se ao facto de a HCQ permanecer ligada à melanina do epitélio pigmentado da retina (EPR) durante um longo período de tempo ou, mais provavelmente, através de um efeito de desequilíbrio metabólico dos fotorreceptores, sendo que quanto maior a duração da exposição tóxica, maior a probabilidade de estas células eventualmente descompensarem e acabarem por morrer.⁴ O mecanismo subjacente à toxicidade é ainda largamente desconhecido.^{1, 5} Classicamente considerada como sendo baixa, a prevalência de retinopatia é atualmente estimada nos 7,5%, um valor superior ao inicialmente reportado e que aumenta em relação com a maior duração da terapêutica e com uma maior dose diária por peso real.⁶ O protocolo de rastreio atual assenta na

utilização rotineira de meios complementares de diagnóstico não invasivos, como o *spectral-domain optical coherence tomography* (SD-OCT) e a avaliação dos campos visuais.⁵ Considerando a utilidade desta medicação a tantos doentes, o objetivo do rastreio não é o de suspender a medicação ao primeiro resultado anormal, mas sim confirmar de forma definitiva as alterações e suspender a medicação precocemente antes que surjam alterações irreversíveis.⁵ Desta forma, o foco da vigilância clínica reside na identificação de alterações progressivas que possam estar associadas a doses cumulativas crescentes de HCQ, antes que sejam atingidos os estadios tardios de maculopatia “em olho de boi” e atrofia difusa da retina externa e do EPR.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da HCQ na estrutura retiniana (através da determinação da espessura das camadas da retina após segmentação dos *scans* de SD-OCT), assim como na sua função (através da avaliação dos campos visuais), em doentes sem diagnóstico de retinopatia por hidroxicloroquina.

Materiais e Métodos

Desenho do estudo

Estudo retrospectivo transversal que decorreu no Centro de Responsabilidade Integrado em Oftalmologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CRIO-CHUC), Portugal. Este estudo respeitou a Declaração de Helsínquia.

Seleção dos participantes

Foram selecionados os doentes referenciados à Consulta de Retina Médica para rastreio da retinopatia por hidroxicloroquina entre janeiro de 2010 e janeiro de 2017. Dos doentes identificados, foram incluídos neste estudo os que respeitavam os seguintes critérios de inclusão: idade superior a 18 anos; tratamento com hidroxicloroquina por um mínimo de 6 meses e com uma dosagem conhecida; conjunto completo de exames (SD-OCT e campos visuais) efetuados de acordo com o protocolo posteriormente descrito e realizados num espaço de tempo inferior a 3 meses da data da consulta a partir da qual os restantes dados clínicos foram recolhidos.

Os critérios de exclusão compreenderam a existência de qualquer patologia retiniana, inflamação intraocular, glaucoma ou outra neuropatia ótica; equivalente esférico superior a $\pm 6,0$ dioptrias; presença de catarata ou outra opacidade dos meios; colaboração inadequada, que impeça a obtenção de sinal adequado nos *scans* de SD-OCT; exames complementares não realizados de acordo com o protocolo do estudo; tratamento prévio com cloroquina; e registos médicos incompletos, impedindo a obtenção de informação relativa à dosagem e duração do tratamento com hidroxicloroquina. Foi ainda considerado como critério de exclusão o diagnóstico clínico de retinopatia por hidroxicloroquina, tendo este sido efetuado pelo perito I.P. em todos os casos e de acordo com as normas internacionais.⁵ Idealmente, este diagnóstico deve ser feito precocemente

através dos métodos de rastreio: na perimetria computadorizada, podem ser observados escotomas parafoveais que podem ser os indícios mais precoces de toxicidade, devendo ser confirmados numa perimetria subsequente e, se mantidos, avaliados por um método objetivo como o SD-OCT;^{1, 7} nos *scans* de SD-OCT observa-se adelgaçamento (ou mesmo perda), frequentemente focal e parafoveal, da camada de fotorreceptores, EPR e camada nuclear externa (CNE);¹ na autofluorescência do fundo ocular, um aumento parafoveal do sinal de autofluorescência pode ser detetado.¹ Em fases avançadas, o diagnóstico é feito pela observação clínica bilateral de maculopatia “em olho de boi”, devida à despigmentação parafoveal do EPR poupando a fóvea.^{1, 5}

Colheita dos dados

Foi construída uma tabela para a recolha retrospectiva dos dados dos processos clínicos dos doentes selecionados. Estes dados compreenderam a idade, sexo, peso, altura, patologia de base para a qual a hidroxiclороquina foi prescrita e respetivo ano de diagnóstico, refração manifesta, data de início e dosagem da HCQ assim como informação referente a todas as alterações feitas à dosagem deste fármaco durante o período de tratamento com o mesmo. Foi calculado o índice de massa corporal (IMC) em kg/m^2 , como o rácio entre o peso e o quadrado da altura em metros. Foram ainda recolhidos dados relativos à presença de fatores de risco para toxicidade, nomeadamente a presença de patologia renal ou hepática concomitante, ou o uso de tamoxifeno. A informação referente à existência de doença renal ou hepática concomitante foi obtida por consulta dos processos clínicos dos doentes, incluindo informação providenciada por outras especialidades médicas, não tendo sido efetuados exames complementares específicos para a deteção destes diagnósticos no âmbito deste estudo.

Através da multiplicação da dose diária de HCQ pela duração do período de tratamento foi obtida a dose cumulativa total em gramas. Nos casos em que a dose foi sujeita a alterações ao longo do período de tratamento, foram recolhidos os dados referentes a cada uma das alterações, tendo a dose cumulativa resultado da soma algébrica do cálculo anterior para cada período de tratamento (dose cumulativa total = dose_A x duração_A + dose_B x duração_B + ...). De acordo com as normas internacionais,⁵ a dose diária em miligramas por quilogramas foi calculada pela divisão da dose diária em miligramas pelo peso corporal real em quilogramas.

Protocolo de exames complementares de diagnóstico

Todos os doentes realizaram SD-OCT com o sistema *Spectralis*® (*Heidelberg Engineering*, Alemanha) respeitando o mesmo protocolo: após midríase farmacológica, o doente foi instruído a fixar um alvo interno durante a aquisição das imagens, sob o controlo do *software* de seguimento ocular em tempo real *Tru-Track*® (*Heidelberg Engineering*). Foi efetuado um varrimento retiniano consistindo em 25 cortes horizontais axiais na área macular, tendo, de seguida, sido contruído um mapa circular da espessura retiniana, que compreende médias numéricas de espessura da retina em cada um dos 9 setores do mapa definido pelo estudo ETDRS – *Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study*. Os 9 setores definidos por este estudo consistem numa área central em disco com 1 mm de diâmetro, rodeada por 2 anéis concêntricos, com 3 mm (interno) e 6 mm (externo) de diâmetro, subdivididos em 4 setores cada. O mapa de espessura da retina contém, assim, uma área central (1 mm de diâmetro), rodeada por 2 anéis: interno ou parafoveal (3 mm de diâmetro) e externo ou perifoveal (6 mm de diâmetro), subdivididos em 4 quadrantes, resultando nos 9 setores: central, interno superior, interno nasal, interno

inferior, interno temporal, externo superior, externo nasal, externo inferior e externo temporal.

Foi utilizado o mesmo aparelho *Spectralis*® em todos os doentes, com a versão 1.9.13.0 do *software Heidelberg Eye Explorer*. Ambos os módulos *HRA2/Spectralis Family Acquisition Module* e *HRA/Spectralis Viewing Module* foram utilizados na versão 6.5.2.0. De forma a ser obtida a espessura média de cada camada retiniana em cada um dos 9 setores anteriormente referidos, foi usado o *software* de segmentação automática integrado no sistema para diferenciar e quantificar as seguintes camadas: (1) espessura retiniana total, (2) camada de fibras nervosas (CFN), (3) camada de células ganglionares (CCG), (4) camada plexiforme interna (CPI), (5) camada nuclear interna (CNI), (6) camada plexiforme externa (CPE), (7) camada nuclear externa (CNE), (8) epitélio pigmentado da retina (EPR), (9) camadas da retina interna (compreendendo a espessura desde a membrana limitante interna até à membrana limitante externa), e (10) camadas da retina externa (desde a membrana limitante externa até ao epitélio pigmentado da retina). Todas as imagens foram analisadas pelo perito A. N., ignorante da informação clínica dos doentes. Os participantes em que se considerou existirem erros de segmentação foram excluídos da análise, não tendo sido efetuados ajustes manuais ou correções da segmentação.

A perimetria computadorizada foi efetuada com o protocolo de rotina do *Humphrey Field Analyzer* (HFA, Zeiss Humphrey Systems, Dublin, CA) usando o algoritmo *Swedish Interactive Threshold Algorithm* (SITA) padrão 10-2, com um estímulo tamanho III de Goldmann. Para cada doente foram obtidos os valores dos índices sumários dos campos visuais: *mean deviation* (MD) e *pattern-standard deviation* (PSD). Nos casos em que os índices de confiança dos campos visuais excediam os valores limite definidos pelas normas clínicas do fabricante do SITA⁸ (mais de 20% de perdas de fixação e 15% de

falsos positivos, sem considerar falsos negativos), os dados dos campos visuais foram excluídos da análise.

No caso dos doentes com mais de um exame de cada tipo em diferentes pontos temporais, apenas foi incluído para análise o conjunto de exames mais recente que cumprisse os critérios de inclusão no estudo.

Análise dos dados

De forma semelhante ao já realizado em trabalhos anteriores,⁹ os doentes foram divididos em 2 grupos: um incluindo doentes com tratamento de duração inferior a 5 anos e outro constituído por doentes com pelo menos 5 anos de tratamento, sendo considerados, respetivamente, utilizadores de “curto-prazo” e utilizadores de “longo-prazo”. O objetivo foi o de possibilitar uma estimativa mais precisa do efeito do tratamento de longo prazo com hidroxicloroquina, para além da permitida pela análise geral da amostra.

As variáveis binárias e categóricas foram expressas como frequências e percentagens, enquanto as variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão. A distribuição normal das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Nos casos em que a normalidade foi verificada, as comparações relacionadas com variáveis contínuas foram feitas pelo *t-test* independente, ou com testes não paramétricos nos casos em que a normalidade não foi verificada. Nas tabelas de frequências as associações foram medidas pelo teste Chi-quadrado. As associações entre variáveis contínuas foram estimadas pela correlação de Pearson. Para os parâmetros estudados na tabela 1 e gráfico 1 foram efetuadas análises univariadas usando regressões lineares. As variáveis com um valor $p \leq 0,250$ foram incluídas nas análises multivariadas, usando uma abordagem *forward (step-up)* para serem obtidos os modelos finais apresentados. Os

valores de R-quadrado são relatados como uma medida geral da adequação dos modelos multivariados.

Para a análise estatística, foi feita a média dos 4 setores de cada um dos anéis interno e externo dos mapas ETDRS. Deste modo, para cada camada da retina de cada olho, os dados foram agregados em: 1) área macular central (setor central, com 1 mm de diâmetro), 2) anel interno ou parafoveal (a média dos setores interno superior, interno nasal, interno inferior e interno temporal), e 3) anel externo ou perifoveal (a média dos setores externo superior, externo nasal, externo inferior e externo temporal). Os dados da CFN, CCG e CPI foram agregados e renomeados complexo de células ganglionares.

Toda a análise estatística foi efetuada usando o Stata®, versão 14.1 (Stata Corp LP, College Station, TX, EUA) e os valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Análise geral e caracterização da amostra

Foram revistos os processos clínicos de 185 doentes referenciados à Consulta de Retina Médica do CRIO-CHUC para rastreio de retinopatia por HCQ entre janeiro de 2010 e janeiro de 2017. Destes, 92 doentes foram excluídos por: SD-OCT e campos visuais não realizados de acordo com o protocolo preconizado neste estudo (n=33), ausência de informação relativa à dose e duração do tratamento com HCQ (n=23), tratamento prévio com cloroquina (n=10), primeiro conjunto de exames disponíveis realizados numa data posterior à cessação do tratamento com HCQ (n=10), erro refrativo superior a $\pm 6,0$ D (n=8) e diagnóstico de retinopatia por HCQ (n=8). Dos 93 doentes incluídos no estudo, foram ainda excluídos um total de 7 olhos por doenças oculares concomitantes, incluindo glaucoma, oclusão da veia central da retina e degenerescência macular relacionada com a idade.

Desta forma, foram analisados os dados resultantes de um total de 179 olhos de 93 doentes, com idade média de $55,87 \pm 12,92$ anos (intervalo: 27-80) e predominância do sexo feminino (84,92%, n=152). Todos os doentes (100%) eram caucasianos europeus.

A patologia de base mais frequente foi o LES (49,72%, n=88), seguida da AR (33,90%, n=60). Das restantes patologias, nenhuma atingiu uma frequência de 5,0%, sendo a Síndrome de Sjögren (SS) a mais frequente neste grupo (4,52%, n=8). A duração média da doença foi de $11,89 \pm 8,85$ anos (intervalo: 1-53).

A duração média do tratamento com HCQ foi de $8,36 \pm 5,11$ anos (intervalo: 6 meses – 20 anos). Como descrito na secção Métodos, os doentes foram divididos em dois grupos de acordo com a duração do tratamento e considerando um ponto de corte de 5 anos. Doentes com menos de 5 anos de tratamento com HCQ formaram o grupo de curto-prazo, enquanto os doentes com pelo menos 5 anos de tratamento com HCQ

representaram os efeitos de longo-prazo do fármaco. Daqui resultaram 49 olhos de 25 doentes (27,37%) integrados no grupo de curto-prazo e 130 olhos de 68 doentes (72,63%) integrados no grupo de longo-prazo.

Ambos os grupos eram semelhantes ($p>0,05$) para todas as características clínicas, incluindo o sexo, idade, peso, altura, IMC e equivalente esférico (Tabela 1). A dose diária de HCQ em mg/kg de peso real também era semelhante entre os dois grupos (curto-prazo: $5,30\pm 1,21$; longo-prazo: $4,98\pm 1,64$; $p=0,225$). Como expectável, os grupos diferiram significativamente em termos de anos de doença (curto-prazo: $5,12\pm 4,19$; longo-prazo: $14,16\pm 8,85$; $p<0,001$), anos de tratamento com HCQ (curto-prazo: $2,94\pm 1,16$; longo-prazo: $10,41\pm 4,49$; $p<0,001$) e dose cumulativa total em gramas (curto-prazo: $378,20\pm 165,40$; longo-prazo: $1254,72\pm 638,99$; $p<0,001$).

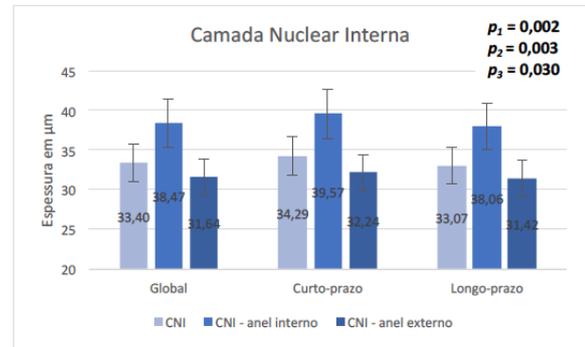
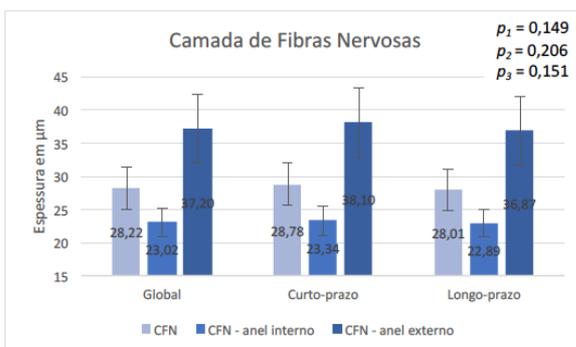
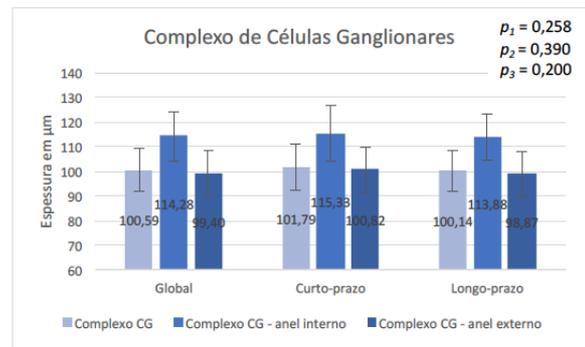
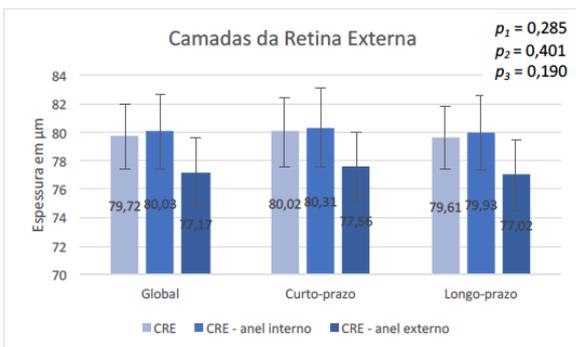
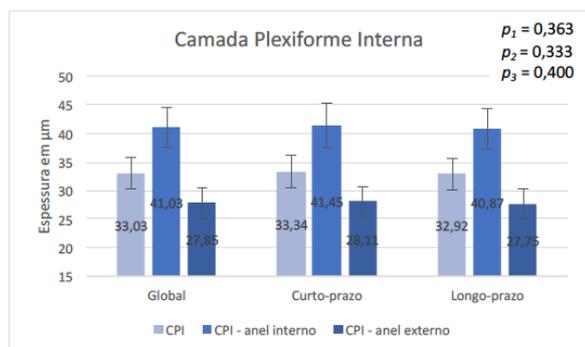
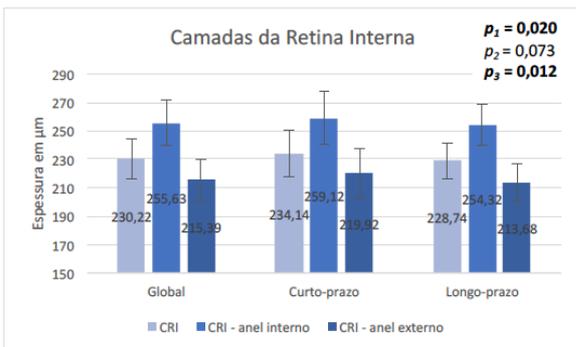
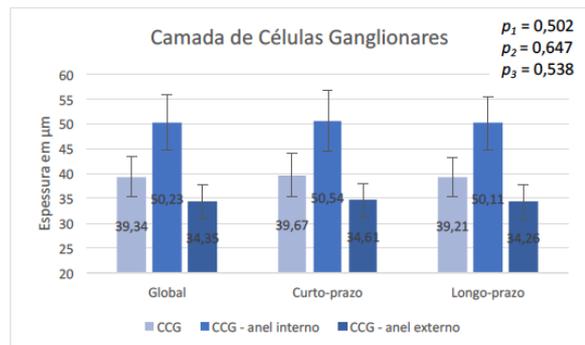
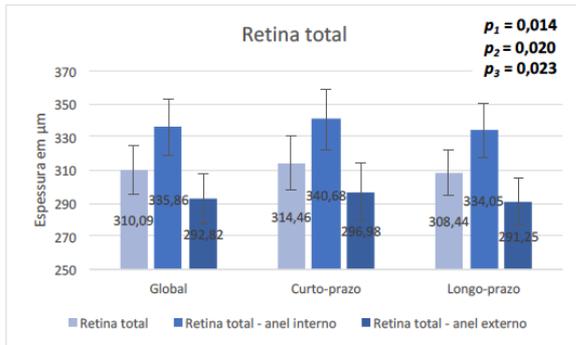
Apenas 2 doentes apresentavam história de doença renal e nenhum doente apresentava história de tratamento com tamoxifeno (atual ou passado) ou de doença hepática. Considerando a baixa ou nula frequência destes fatores de risco na presente amostra, não foram considerados na análise univariada e multivariada subsequente.

Tabela 1 - Características clínicas da população em estudo

	Global	Curto-prazo	Longo-prazo	p
Olhos, n (%)	179 (100)	49 (27,37)	130 (72,63)	
Gênero				
Masculino, n (%)	27 (15,08)	10 (20,41)	17 (13,08)	0,222
Feminino, n (%)	152 (84,92)	39 (79,59)	113 (86,92)	
Idade, anos (média ± DP)	55,87±12,92	53,45±13,52	56,78±12,62	0,124
Peso, kg (média ± DP)	67,38±12,37	66,57±11,86	67,70±12,60	0,590
Altura, m (média ± DP)	1,60±0,07	1,62±0,05	1,59±0,07	0,381
IMC, kg/m² (média ± DP)	28,69±6,81	24,48±6,44	30,18±6,46	0,077
Equivalente esférico, D (média ± DP)	-0,42±1,95	-0,87±2,35	-0,28±1,80	0,184
Dose diária de HCQ, mg/kg de peso corporal real (média ± DP)	5,07±1,54	5,30±1,21	4,98±1,64	0,225
Anos de doença (média ± DP)	11,89±8,85	5,12±4,19	14,16±8,85	<0,001
Anos de tratamento com HCQ (média ± DP)	8,36±5,11	2,94±1,16	10,41±4,49	<0,001
Dose cumulativa total, g (média ± DP)	1014,78±675,93	378,20±165,40	1254,72±638,99	<0,001

Análise de acordo com os grupos de estudo

Os valores médios da espessura das camadas retinianas de ambos os grupos de estudo, bem como a sua distribuição global e pelos anéis interno e externo, são apresentados no Gráfico 1.



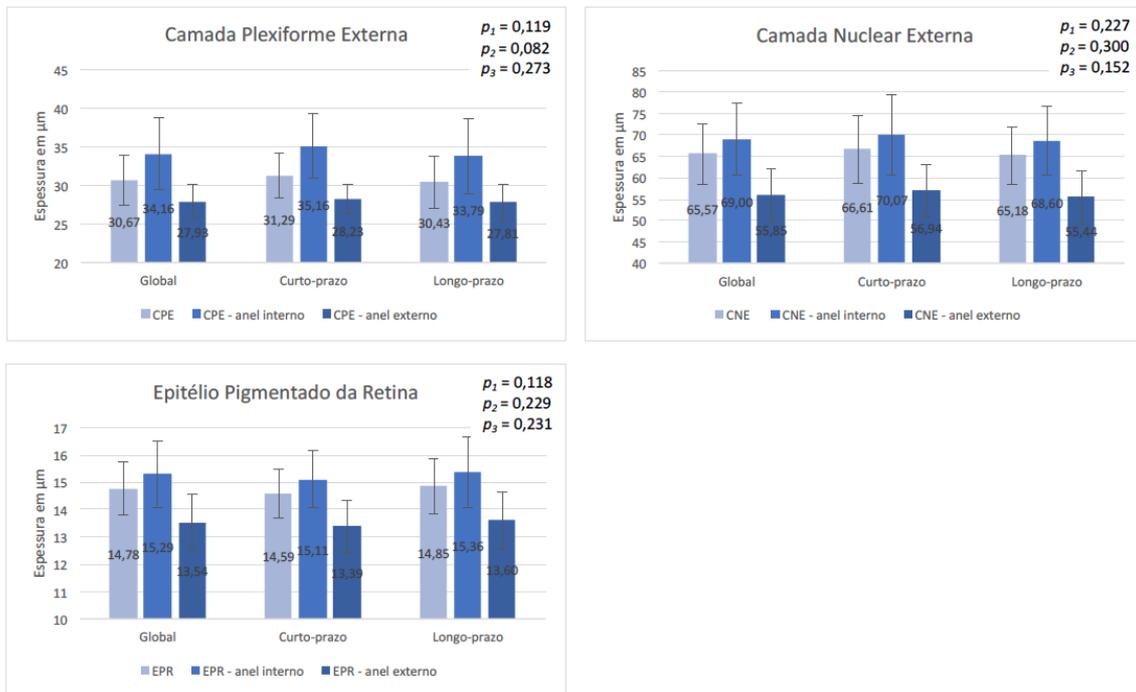


Gráfico 1 - Análise da espessura total, do anel interno e do anel externo para cada uma das camadas da retina, de acordo com o grupo de estudo. O valor p_1 indica o p-value correspondente à comparação dos valores da espessura total da camada em estudo, entre os grupos de curto e longo-prazo. O valor p_2 indica o p-value correspondente à comparação dos valores da espessura do anel interno da camada em estudo, entre os grupos de curto e longo-prazo. O valor p_3 indica o p-value correspondente à comparação dos valores da espessura do anel externo da camada em estudo, entre os grupos de curto e longo-prazo. Os p-values significativos são apresentados a negrito.

A espessura global da retina, em μm , foi significativamente menor no grupo de longo-prazo (curto-prazo: $314,46 \pm 16,30$; longo-prazo: $308,44 \pm 13,71$; $p=0,014$), observando-se o mesmo resultado nos anéis interno (curto-prazo: $340,68 \pm 18,21$; longo-prazo: $334,05 \pm 16,21$; $p=0,020$) e externo (curto-prazo: $296,98 \pm 17,38$; longo-prazo: $291,25 \pm 13,85$; $p=0,023$) isoladamente. Esta diminuição da espessura deveu-se, principalmente, a uma diminuição das camadas da retina interna (curto-prazo: $234,14 \pm 16,01$; longo-prazo: $228,74 \pm 12,82$; $p=0,020$). Foi ainda observada, no grupo de longo-prazo, uma redução significativa da espessura da CNI (curto-prazo: $34,29 \pm 2,45$; longo-prazo: $33,07 \pm 2,26$; $p=0,002$), que se manteve tanto no anel interno (curto-prazo:

39,57±3,17; longo-prazo: 38,06±2,89; p=0,003) como no anel externo (curto-prazo: 32,24±2,21; longo-prazo: 31,42±2,28; p=0,030).

No grupo de longo prazo, realizou-se uma análise de correlação para avaliar se uma maior dose cumulativa de HCQ estava associada a uma diminuição progressiva da espessura de algumas camadas da retina. No anel interno, observou-se uma correlação inversa entre a dose cumulativa de HCQ e a espessura da maioria das camadas da retina interna. Assim, nesta região parafoveal, o complexo de células ganglionares e as camadas internas da retina apresentaram uma correlação inversa (negativa) com a dose cumulativa de HCQ, apresentando coeficientes de correlação de -0,32 (p<0,001) e -0,18 (p=0,045), respectivamente. Aplicando a mesma análise a cada camada individualmente, a CCG (r=-0,32; p<0,001) foi a que apresentou a correlação inversa mais forte com a dose cumulativa de HCQ. Nenhuma das camadas retinianas externas (CPE, CNE e EPR) apresentou uma correlação significativa com a dose cumulativa.

Análise univariada e multivariada

Considerando os resultados obtidos na abordagem exploratória descrita previamente, a análise univariada e multivariada foi construída direcionada à área parafoveal (anel interno) dos dados agregados das camadas da retina interna e complexo de células ganglionares.

A análise univariada revelou que o sexo feminino ($\beta=-0,289$; p<0,001) e a dose cumulativa de HCQ ($\beta=-0,152$; p=0,042) estavam significativamente associados com a espessura parafoveal das camadas internas da retina. A idade, com um valor p inferior a 0,250 ($\beta=-0,092$; p=0,220), também foi incluída na análise multivariada. O melhor modelo multivariado (R-quadrado = 10,78%) demonstrou que, mesmo ajustando para o sexo feminino ($\beta=-0,291$; p<0,001), a dose cumulativa de HCQ ($\beta=-0,156$; p=0,029)

estava significativamente associada com a espessura parafoveal das camadas internas da retina.

A análise univariada revelou que a dose cumulativa de HCQ ($\beta=-0,227$; $p=0,002$) e o sexo feminino ($\beta=-0,177$; $p=0,018$) estavam significativamente associados com a espessura parafoveal do complexo de células ganglionares. Da mesma forma, a idade ($\beta=-0,098$; $p=0,192$) e o equivalente esférico ($\beta=0,166$; $p=0,088$) também foram incluídos no modelo multivariado. O melhor modelo multivariado (R-quadrado = 15,73%) mostrou que, mesmo ajustando para a idade ($\beta=-0,111$; $p=0,267$), sexo feminino ($\beta=-0,259$; $p=0,006$) e equivalente esférico ($\beta=0,245$; $p=0,014$), a dose cumulativa de HCQ ($\beta=-0,239$; $p=0,011$) estava significativamente associada com a espessura parafoveal do complexo de células ganglionares. Após ajustar para os fatores de confusão, verificou-se que a espessura parafoveal do complexo de células ganglionares diminui 0,004 μm por cada aumento de 1 grama na dose cumulativa de HCQ.

Avaliação funcional

A média do MD e PSD para a amostra no global foi de $-2,01\pm 1,99$ e $1,54\pm 0,88$ dB, respetivamente. Tanto o MD (curto-prazo: $-2,18\pm 1,68$; longo-prazo: $-1,95\pm 2,09$; $p=0,490$) como o PSD (curto-prazo: $1,49\pm 0,55$; longo-prazo: $1,55\pm 0,98$; $p=0,688$) foram semelhantes entre os grupos. Nem o MD ($r=0,01$; $p=0,872$) nem o PSD ($r=0,03$; $p=0,689$) se correlacionaram com a dose cumulativa de HCQ.

Discussão

Os resultados deste estudo retrospectivo transversal, que incluiu doentes referenciados para rastreio de retinopatia por HCQ, sem o diagnóstico desta ou de outras patologias da retina, e com exame oftalmológico normal, sugerem que doses cumulativas crescentes de HCQ induzem uma diminuição progressiva da espessura da retina ao longo do tempo, especialmente das camadas internas da retina, avaliadas após segmentação automática de *scans* de SD-OCT. Os índices sumários dos campos visuais (MD e PSD), que permitem a avaliação funcional da retina, não refletiram, neste estudo, os efeitos de longo prazo da HCQ.

O mecanismo exato de toxicidade pela HCQ é ainda largamente desconhecido e controverso.^{1, 5} Apesar disto, a maioria dos estudos aponta para um envolvimento da retina externa, especialmente dos fotorreceptores e do EPR,^{7, 10-12} o que vai de encontro ao mecanismo proposto de acumulação do fármaco nos tecidos pigmentados da retina.¹³ Já foi demonstrado também que, tanto a HCQ como a cloroquina, interferem no ciclo visual através da inibição do polipeptídeo transportador de aniões orgânicos 1A2 (OATP1A2), normalmente expresso no EPR, onde medeia a captação celular do *all-trans-retinol* que, pelo efeito inibitório da HCQ, se acumula no exterior das células do EPR levando à interrupção do ciclo visual normal e resultando em degenerescência retiniana com repercussões na função visual.¹⁴ Outro mecanismo proposto de toxicidade consiste na perda da integridade da barreira hemato-retiniana resultante do aumento da permeabilidade do EPR que a HCQ induz.¹⁵ Apesar disto, a sequência de eventos que precede o estabelecimento de toxicidade manifesta não é ainda conhecido, uma vez que já foram reportados casos de degenerescência da retina externa/camada de fotorreceptores antes de qualquer dano estrutural aparente do EPR.⁹ A progressão da retinopatia após a suspensão do fármaco também poderá ser prevista pela perda da integridade da membrana

limitante externa, tendo um estudo associado a preservação da integridade desta membrana, aquando do diagnóstico de retinopatia por HCQ, à ausência de progressão da toxicidade após a suspensão do fármaco.¹⁶ A coróide também poderá estar envolvida na fisiopatologia desta toxicidade, com um estudo a relatar uma diminuição progressiva da espessura da coriocapilar associada a doses cumulativas crescentes de HCQ.¹⁷

A maioria dos artigos mais recentes relacionados com o tópico da retinopatia por HCQ são dirigidos à retina externa e EPR. No entanto, um estudo realizado com a cloroquina em modelos animais demonstrou um profundo efeito deste fármaco a nível das células ganglionares da retina.¹³ Outro estudo, também em modelos animais, demonstrou que a cloroquina afeta a fosfolipidose na neurorretina, mas não no EPR.¹⁸ Contudo, até recentemente, pouco se sabia sobre se o mesmo era observado com a HCQ na retina humana. Neste sentido, um estudo demonstrou que a espessura macular da CCG e da CPI apresentava uma correlação inversa com doses cumulativas de HCQ, especialmente em doentes com uma dose cumulativa superior a 1000 g.¹⁹ Outro estudo relatou a mesma correlação inversa nestas camadas em doentes tratados com HCQ relativamente a controlos.²⁰ Embora com uma amostra mais pequena, outro estudo demonstrou a existência de diminuição da espessura da retina interna previamente ao desenvolvimento de alterações no EPR ou camada de fotorreceptores.²¹ Tal como em praticamente todos os estudos sobre este tema,^{9, 17, 22-24} a natureza retrospectiva transversal deste estudo não permite tirar conclusões relacionadas com a sequência de eventos que precede a toxicidade. Apesar desta limitação, os nossos resultados vão de encontro aos obtidos nestes estudos, reforçando a convicção de que os efeitos do tratamento de longo-prazo com HCQ não se limitam à retina externa. De facto, não só a dose cumulativa crescente de HCQ se correlacionou com a perda de células ganglionares, como a espessura da CNI apresentou diferenças significativas entre os grupos de tratamento de

curto e longo prazo. Embora tenha sido observada uma tendência para a diminuição da espessura da retina externa e da CNE, os valores obtidos não atingiram significância estatística neste estudo, o que poderá dever-se ao facto de apenas terem sido incluídos doentes sem diagnóstico de retinopatia por HCQ.

Os modelos multivariados construídos para os efeitos deste estudo tiveram em conta um número significativo de fatores de confusão. Para esta análise, a recolha de dados deste estudo foi desenhada de acordo com os fatores de risco incluídos nas recomendações da Academia Americana de Oftalmologia e para os quais existe evidência científica significativa.⁵ Todos os doentes com patologia da retina ou diagnóstico de glaucoma foram excluídos, uma vez que a presença destes fatores poderia não só induzir erros na segmentação das camadas da retina, mas também alterações na espessura da retina (especialmente nas camadas internas, no caso do glaucoma) que não estariam relacionadas com a retinopatia por HCQ. Embora não tenham sido incluídos na análise estatística por não terem atingido uma frequência relevante neste estudo, foram colhidos dados relativos à presença de doença renal ou hepática e uso de tamoxifeno, que são fatores de risco adicional reconhecidos.⁵ Considerando que a doença renal é uma comorbilidade relativamente frequente nas doenças de base que podem justificar a prescrição de HCQ,⁵ reconhecemos que a presença de doença renal na população em estudo poderá estar sub-reportada, o que constitui uma limitação deste estudo. No entanto, nunca foi definido um valor limite a partir do qual o diagnóstico de “doença renal” acarretaria um significativo aumento de risco para o desenvolvimento de retinopatia.⁵ A correlação com a taxa de filtração glomerular, embora já efetuada em outros estudos,⁶ não foi possível neste devido à ausência desta informação nos processos clínicos da maioria dos doentes incluídos. A idade foi incluída nos modelos multivariados não só porque constitui, em si própria, um fator de risco para toxicidade,⁵ mas também porque

já foi associada a diminuição da espessura de algumas camadas da retina na segmentação com o SD-OCT *Spectralis*, mesmo em olhos saudáveis.^{25, 26} Da mesma forma, o sexo e o equivalente esférico (embora tenham sido excluídos olhos com mais de $\pm 6,0$ D) foram incluídos nestes modelos, uma vez que estes fatores de confusão (usando o equivalente esférico como marcador substitutivo para o comprimento axial) podem ser responsáveis por alguma variabilidade na espessura da retina de olhos saudáveis.²⁶ Por fim, de acordo com as evidências mais recentes,^{1, 5} o peso corporal real foi utilizado no cálculo da dose diária em vez do peso corporal ideal.

Este estudo foi desenhado conjugando dados estruturais e funcionais para uma melhor caracterização das (possíveis) alterações induzidas pelo tratamento sistémico com HCQ. A interpretação dos resultados da avaliação dos campos visuais continua a ser a ferramenta subjetiva de rastreio mais sensível.¹ As alterações precoces tanto podem ser consideradas insignificantes e interpretadas como não indiciando toxicidade,²⁷ como podem ser a evidência mais precoce da existência de dano na retina.⁵ De forma a ultrapassar esta limitação e introduzir um elemento de objetividade que auxilie o médico que conduz o rastreio, centrámo-nos nos resultados numéricos fornecidos pelo exame Humphrey dos campos visuais: MD e PSD. Estes dois indicadores são muito difundidos na prática clínica e têm uma importância preponderante em todos os sistemas de estadiamento da gravidade do glaucoma,²⁸ para além de já ter sido demonstrada a sua correlação com a espessura macular em doentes com glaucoma.²⁹ Contudo, neste estudo, ambos os indicadores foram semelhantes nos doentes com tratamento de curto e longo-prazo, e nenhum deles se correlacionou com a dose cumulativa de HCQ, facto que já foi demonstrado por outros autores.³⁰ Na nossa opinião, estes resultados, pelo menos até certa medida, eram esperados. Em primeiro lugar, estes índices foram desenvolvidos e validados para o diagnóstico e avaliação de dano glaucomatoso, podendo não se traduzir

diretamente na perda de células ganglionares associadas com a retinopatia por HCQ. Este facto toma ainda maior importância quando consideramos que a população deste estudo era uma população saudável, sem diagnóstico de retinopatia, e em que, a existir dano, este seria mínimo. Estes resultados reforçam as recomendações mais recentes de que o oftalmologista se deve focar principalmente na presença e consistência dos escotomas paracentrais, especialmente se contíguos,^{1, 5} ao longo do seguimento dos doentes no tempo, do que nos resultados numéricos fornecidos pelo *software* de análise dos campos visuais.

A integração da caracterização estrutural e funcional dos efeitos da HCQ, numa população de doentes tida como saudável e sem o diagnóstico de retinopatia por HCQ, constitui um dos principais pontos fortes deste estudo. Esta integração da caracterização estrutural (SD-OCT) e funcional (análise dos campos visuais) vai de encontro às normas de rastreio mais recentes.⁵ Contrariamente a outros estudos que quantificaram a espessura retiniana global ou de camadas da retina isoladamente como o complexo de células ganglionares macular,^{4, 19-21, 31} ou que classificaram subjetivamente alterações na retina externa, camada dos fotorreceptores e junção do segmento interno/segmento externo,^{10, 11, 24} no nosso estudo efetuámos uma segmentação automática das camadas da retina, de forma sistemática e objetiva, o que permitiu a obtenção de uma quantidade de dados consistente e minuciosa para caracterizar objetivamente, quantificar e localizar os efeitos de longo-prazo da HCQ. Uma abordagem semelhante já foi aplicada por outros grupos, no entanto, a partir do uso de um algoritmo de segmentação próprio.^{9, 32} Pelo contrário, a nossa abordagem, aplicando o algoritmo de segmentação disponível num equipamento comercial muito utilizado, favorece a replicação destes resultados. Ademais, contrariamente a outros estudos que se focaram em doentes com retinopatia por HCQ e o seu seguimento após a cessação do fármaco,^{12, 32} neste estudo focámo-nos em doentes

com exame oftalmológico normal. Devido a isto, não esperávamos alterações dramáticas, como, aliás, pode ser deduzido pelos coeficientes de correlação baixos a moderados que reportamos. No entanto, a constatação de dados tão consistentes e objetivos permite concluir e alertar os oftalmologistas para o facto de que um SD-OCT aparentemente normal não implica necessariamente a ausência de alterações significativas provocadas pelo uso prolongado do fármaco HCQ.

A principal limitação deste estudo reside no seu desenho retrospectivo transversal. Embora a dimensão da nossa população seja superior à utilizada na maioria dos estudos publicados sobre este tema,^{9-12, 20, 24, 31-33} reconhecemos que poderiam ter sido obtidos resultados mais significativos com um maior tamanho de amostra. A nossa caracterização estrutural e funcional restringiu-se à área macular central, uma vez que há um consenso mais ou menos generalizado de que os efeitos mais precoces da HCQ se localizam especialmente na parafóvea (2 a 6 graus da fóvea).^{1, 5} No entanto, isto poderá não ser aplicável a todos os doentes, uma vez que alguns estudos já demonstraram que em doentes asiáticos a toxicidade por HCQ assume um padrão de retinopatia mais periférica que se estende às arcadas vasculares.^{22, 23} Contudo, não consideramos que esta opção condicione um viés significativo neste estudo, uma vez que a nossa população era constituída por uma amostra extremamente homogénea de doentes caucasianos de descendência europeia, população na qual este padrão mais periférico apenas foi relatado em 2% dos casos.²²

Conclusão

Em conclusão, este estudo demonstrou que doses cumulativas de HCQ levam a diminuição progressiva da espessura da retina interna paracentral, na ausência de retinopatia clinicamente diagnosticada. Os índices sumários dos campos visuais não refletiram os efeitos do tratamento de longo-prazo com HCQ.

Agradecimentos

Gostaria de aproveitar esta oportunidade para agradecer à minha Orientadora, Professora Doutora Isabel Pires, pela partilha de conhecimentos, disponibilidade, apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Aproveito ainda para agradecer ao meu Co-Orientador, Doutor Pedro Gil, por toda a atenção que me dispensou ao longo destes meses, pelo encorajamento, respostas rápidas e esclarecedoras, e pelo apoio na análise estatística e escrita do texto.

Referências bibliográficas

1. Yusuf IH, Sharma S, Luqmani R, Downes SM. Hydroxychloroquine retinopathy. *Eye (Lond)* 2017;**31**(6):828-845.
2. Al-Bari MA. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J Antimicrob Chemother* 2015;**70**(6):1608-21.
3. Goldman FD, Gilman AL, Hollenback C, Kato RM, Premack BA, Rawlings DJ. Hydroxychloroquine inhibits calcium signals in T cells: a new mechanism to explain its immunomodulatory properties. *Blood* 2000;**95**(11):3460-6.
4. Marmor MF, Hu J. Effect of disease stage on progression of hydroxychloroquine retinopathy. *JAMA Ophthalmol* 2014;**132**(9):1105-12.
5. Marmor MF, Kellner U, Lai TY, Melles RB, Mieler WF. Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine Retinopathy (2016 Revision). *Ophthalmology* 2016;**123**(6):1386-94.
6. Melles RB, Marmor MF. The risk of toxic retinopathy in patients on long-term hydroxychloroquine therapy. *JAMA Ophthalmol* 2014;**132**(12):1453-60.
7. Marmor MF. Comparison of screening procedures in hydroxychloroquine toxicity. *Arch Ophthalmol* 2012;**130**(4):461-9.
8. Heijl A, Patella V, Bengtsson B. The Field Analyzer Primer: Effective Perimetry. In. 4 ed: Carl Zeiss Meditec, Inc; 2012.
9. de Sisternes L, Hu J, Rubin DL, Marmor MF. Analysis of Inner and Outer Retinal Thickness in Patients Using Hydroxychloroquine Prior to Development of Retinopathy. *JAMA Ophthalmol* 2016.
10. Rodriguez-Padilla JA, Hedges TR, 3rd, Monson B, Srinivasan V, Wojtkowski M, Reichel E, Duker JS, Schuman JS, Fujimoto JG. High-speed ultra-high-resolution optical

coherence tomography findings in hydroxychloroquine retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2007;**125**(6):775-80.

11. Kellner S, Weinitz S, Kellner U. Spectral domain optical coherence tomography detects early stages of chloroquine retinopathy similar to multifocal electroretinography, fundus autofluorescence and near-infrared autofluorescence. *Br J Ophthalmol* 2009;**93**(11):1444-7.

12. Mititelu M, Wong BJ, Brenner M, Bryar PJ, Jampol LM, Fawzi AA. Progression of hydroxychloroquine toxic effects after drug therapy cessation: new evidence from multimodal imaging. *JAMA Ophthalmol* 2013;**131**(9):1187-97.

13. Rosenthal AR, Kolb H, Bergsma D, Huxsoll D, Hopkins JL. Chloroquine retinopathy in the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;**17**(12):1158-75.

14. Xu C, Zhu L, Chan T, Lu X, Shen W, Madigan MC, Gillies MC, Zhou F. Chloroquine and Hydroxychloroquine Are Novel Inhibitors of Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2. *J Pharm Sci* 2016;**105**(2):884-890.

15. Korthagen NM, Bastiaans J, van Meurs JC, van Bilsen K, van Hagen PM, Dik WA. Chloroquine and Hydroxychloroquine Increase Retinal Pigment Epithelial Layer Permeability. *J Biochem Mol Toxicol* 2015;**29**(7):299-304.

16. Scarinci F, Shaarawy A, Narala R, Jampol LM, Fawzi AA. Loss Of External Limiting Membrane Integrity Predicts Progression Of Hydroxychloroquine Retinal Toxicity After Drug Discontinuation. *Retina* 2016;**36**(10):1951-1957.

17. Ahn SJ, Ryu SJ, Joung JY, Lee BR. Choroidal Thinning Associated with Hydroxychloroquine Retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2017.

18. Hallberg A, Naeser P, Andersson A. Effects of long-term chloroquine exposure on the phospholipid metabolism in retina and pigment epithelium of the mouse. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1990;**68**(2):125-30.

19. Lee MG, Kim SJ, Ham DI, Kang SW, Kee C, Lee J, Cha HS, Koh EM. Macular retinal ganglion cell-inner plexiform layer thickness in patients on hydroxychloroquine therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;**56**(1):396-402.
20. Uslu H, Gurler B, Yildirim A, Tatar MG, Aylin Kantarci F, Goker H, Pehlevan HS, Colak HN. Effect of Hydroxychloroquine on the Retinal Layers: A Quantitative Evaluation with Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *J Ophthalmol* 2016;**2016**:8643174.
21. Pasadhika S, Fishman GA. Effects of chronic exposure to hydroxychloroquine or chloroquine on inner retinal structures. *Eye (Lond)* 2010;**24**(2):340-6.
22. Melles RB, Marmor MF. Pericentral retinopathy and racial differences in hydroxychloroquine toxicity. *Ophthalmology* 2015;**122**(1):110-6.
23. Lee DH, Melles RB, Joe SG, Lee JY, Kim JG, Lee CK, Yoo B, Koo BS, Kim JT, Marmor MF, Yoon YH. Pericentral hydroxychloroquine retinopathy in Korean patients. *Ophthalmology* 2015;**122**(6):1252-6.
24. Lally DR, Heier JS, Bauman C, Witkin AJ, Maler S, Shah CP, Reichel E, Waheed NK, Bussell I, Rogers A, Duker JS. Expanded spectral domain-OCT findings in the early detection of hydroxychloroquine retinopathy and changes following drug cessation. *Int J Retina Vitreous* 2016;**2**:18.
25. Bendschneider D, Tornow RP, Horn FK, Laemmer R, Roessler CW, Juenemann AG, Kruse FE, Mardin CY. Retinal nerve fiber layer thickness in normals measured by spectral domain OCT. *J Glaucoma* 2010;**19**(7):475-82.
26. Nieves-Moreno M, Martinez-de-la-Casa JM, Cifuentes-Canorea P, Sastre-Ibanez M, Santos-Bueso E, Saenz-Frances F, Morales-Fernandez L, Garcia-Feijoo J. Normative database for separate inner retinal layers thickness using spectral domain optical coherence tomography in Caucasian population. *PLoS One* 2017;**12**(7):e0180450.

27. Browning DJ, Lee C. Scotoma analysis of 10-2 visual field testing with a red target in screening for hydroxychloroquine retinopathy. *Clin Ophthalmol* 2015;**9**:1499-509.
28. Ng M, Sample PA, Pascual JP, Zangwill LM, Girkin CA, Liebmann JM, Weinreb RN, Racette L. Comparison of visual field severity classification systems for glaucoma. *J Glaucoma* 2012;**21**(8):551-61.
29. Mathers K, Rosdahl JA, Asrani S. Correlation of macular thickness with visual fields in glaucoma patients and suspects. *J Glaucoma* 2014;**23**(2):e98-104.
30. Lai TY, Ngai JW, Chan WM, Lam DS. Visual field and multifocal electroretinography and their correlations in patients on hydroxychloroquine therapy. *Doc Ophthalmol* 2006;**112**(3):177-87.
31. Agarwal P, Wong YH, Dasgupta E, Agarwal R, Livingstone BI, Ramamurthy S, Chyn GS. Early effect of hydroxychloroquine therapy: relationship between cumulative dose and retinal thickness. *Cutan Ocul Toxicol* 2015;**34**(3):179-84.
32. de Sisternes L, Hu J, Rubin DL, Marmor MF. Localization of damage in progressive hydroxychloroquine retinopathy on and off the drug: inner versus outer retina, parafovea versus peripheral fovea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;**56**(5):3415-26.
33. Karti O, Ayhan Z, Zengin MO, Kaya M, Kusbeci T. Choroidal Thickness Changes in Rheumatoid Arthritis and the Effects of Short-term Hydroxychloroquine Treatment. *Ocul Immunol Inflamm* 2017:1-6.