



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nuevos parámetros vasculares de la retina en reconstrucciones tridimensionales de angiografía por tomografía de coherencia óptica: Volumen y Superficie vascular

Silvia Feu Basilio

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Nuevos parámetros vasculares de la retina en reconstrucciones tridimensionales de angiografía por tomografía de coherencia óptica: Volumen y Superficie vascular

Memoria de tesis doctoral presentada por **Silvia Feu Basilio** para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Director: Javier Zarranz-Ventura

Hospital Clínic de Barcelona; Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Tutor: Ricardo Pedro Casaroli-Marano

Hospital Clínic de Barcelona; Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)
Departamento de Cirugía, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

Abril 2025

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer su ayuda y disposición a todos los que han participado en el proyecto, en particular a los optometristas Teresa Hernández, Cristian Oliva, Irene Vila y Rafael Castro, y a los oftalmólogos Sara Marín y Josep Rosinés. También quiero darle las gracias a mi director y mentor, el doctor Javier Zarranz-Ventura, por motivarme, apoyarme y guiarme en todo el proceso. A mi tutor, el doctor Ricardo Casaroli Marano, por su ayuda inestimable. También me gustaría agradecer su gran colaboración, disposición y respaldo a todo el equipo de Basilea y, en especial, a Peter Maloca.

Gracias a Fred por su paciencia infinita y su apoyo incondicional. A toda mi familia, en especial a mis padres, Sonia y Nacho, y a mis hermanas Ana y Teresa, gracias por creer en mí y por siempre estar ahí. A mi abuelo, lo, por contagiarme su amor por la medicina. Y a mi Yaya, que aunque ya no está con nosotros, me ha acompañado en todo momento.

Por último quiero agradecer a todos mis compañeros del Institut Clínic de Oftalmologia del Hospital Clínic de Barcelona su apoyo fundamental en estos últimos años.

FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral se ha desarrollado dentro de un proyecto financiado por la Fundació La Marató de TV3 (2015, Diabetis i Obesitat, código: 201633-10) y el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, a través de los proyectos FIS PI18/00518 (2018), FIS PI21/01384 (2021) y FIS PI24/01225 (2024). Ninguna de las entidades financiadoras ha tenido acceso al análisis o interpretación de los datos. Así mismo, tampoco han repercutido o influenciado de ninguna forma los artículos que forman parte del presente trabajo.

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE FIGURAS	8
2. ÍNDICE DE TABLAS	9
3. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	10
4. ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS QUE COMPONEN LA TESIS	12
5. RESUM EN CATALÀ	13
6. INTRODUCCIÓN	15
6.1 ANATOMÍA VASCULAR DE LA RETINA	16
6.2 FONDO DE OJO Y RETINOGRAFÍA	21
6.3 RETINOGRAFÍA DE CAMPO ULTRA AMPLIO (UWF)	22
6.4 ANGIOGRAFÍA FLUORESCÉINICA (AGF)	24
6.5 TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA (OCT) ESTRUCTURAL	26
6.6 ANGIOGRAFÍA POR TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA (OCTA)	28
6.6.1 OCTA: Estudio de enfermedades oculares	34
6.6.2 OCTA: Estudio de enfermedades vasculares sistémicas	34
6.6.3 OCTA y Oculómica	35
6.7 ANGIOGRAFÍA POR TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA TRIDIMENSIONAL (3D-OCTA) ...	36
6.7.1 2D-OCTA vs. 3D-OCTA	36
6.7.2 3D-OCTA: parámetros cuantitativos	39
7. HIPÓTESIS	42
8. OBJETIVOS	43
9. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	44
9.1 ARTÍCULO 1	44
9.2 ARTÍCULO 2	55
10. DISCUSIÓN	65
10.1 FORTALEZAS DEL ESTUDIO	70
10.2 LIMITACIONES DEL ESTUDIO	71
10.3 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	73
11. CONCLUSIONES	76
12. BIBLIOGRAFÍA	77

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del flujo sanguíneo ocular.	16
Figura 2. Circulación retiniana y coroidea.....	17
Figura 3. Anatomía vascular de la retina.	18
Figura 4. Capas vasculares de la retina	19
Figura 5. Retinografía clásica de un ojo sano.....	21
Figura 6. Comparación de cobertura de imágenes de retinografía de 7 campos ETDRS e imagen de campo amplio	23
Figura 7. Angiografía fluoresceínica y softwares de procesamiento de imágenes	25
Figura 8. OCT Swept-Source y estructuras visualizables	27
Figura 9. Plexos capilares visibles en imágenes de angiografía por tomografía de coherencia óptica	28
Figura 10. Densidad capilar y plexos capilares visibles con OCTA.....	29
Figura 11. Relaciones anatómicas entre los sistemas arterial y venoso y los plexos capilares a partir de la combinación de imágenes de OCTA y retinografía	30
Figura 12. Parámetros derivados de la zona avascular foveal (FAZ).	33
Figura 13. Impresión tridimensional de mapas de flujo vascular retiniano a partir de reconstrucciones tridimensionales de OCTA	38
Figura 14. Comparación de reconstrucciones tridimensionales de OCTA en un estudio piloto en ojos sanos y ojos con retinopatía diabética.	40

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCTA) y angiografía fluoresceínica (AGF).....	31
Tabla 2. Resumen de parámetros cuantitativos medidos en angiografía por tomografía de coherencia óptica	32

3. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2D: bidimensional

2D-OCTA: OCTA bidimensional (o *en face*)

3D: tridimensional

3D-OCTA: reconstrucción tridimensional de OCTA

ACR: Arteria Central de la Retina

ACVI: accidente cerebrovascular isquémico

AGF: Angiografía fluoresceínica

CGR: células ganglionares retinianas

DVC: Complejo vascular profundo

DVP: Plexo vascular profundo

EC: enfermedad coronaria

ELM: membrana limitante externa

ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (Estudio para el tratamiento temprano de la Retinopatía Diabética)

EZ: zona elipsoides

FAZ: zona avascular foveal

FD: Dimensión fractal (FD)

GLM: modelo lineal generalizado

ILM: membrana limitante interna

INL: capa nuclear interna

IPL: capa plexiforme interna

IVP: Plexo vascular intermedio

IZ: zona interdigitación

MZ: zona mioide

OCT: tomografía de coherencia óptica

OCTA: angiografía por tomografía de coherencia óptica

OME: efecto de magnificación ocular

ONL: capa nuclear externa

OPL: capa plexiforme externa

RFNL: capa de fibras nervio óptico

RPCP: Plexo capilar peripapilar radial

RPE: epitelio pigmentado de la retina

SD: Densidad eskeletonizada de los vasos

SD-OCT: tomografía de coherencia óptica (OCT) *spectral-domain*

SS-OCT: tomografía de coherencia óptica (OCT) *swept-source*

SVC: Complejo vascular superficial

SVP: Plexo vascular superficial

TD-OCT: tomografía de coherencia óptica (OCT) *time-domain*

VD: densidad vascular

VDI: Índice de diámetro del vaso

4. ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS QUE COMPONEN LA TESIS

Tesis en formato de compendio de publicaciones, con 2 artículos publicados:

1. Maloca PM, **Feu-Basilio S**, Schottenhamml J, Valmaggia P, Scholl HPN, Rosinés-Fonoll J, Marin-Martinez S, Inglin N, Reich M, Lange C, Egan C, Zweifel S, Tufail A, Spaide RF, Zarranz-Ventura J.

Reference database of total retinal vessel surface area derived from volume-rendered optical coherence tomography angiography.

Sci Rep. 2022;12(1):3695.

Factor de impacto (2022): 4,6 Journal Citation Report (JCR)

Segundo cuartil (22/73, MULTIDISCIPLINARY SCIENCES), JCR 2022

DOI: [10.1038/s41598-022-07439-2](https://doi.org/10.1038/s41598-022-07439-2)

PMID: [35256644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35256644/)

2. **Feu-Basilio S**, Maloca PM, Hasler P, Scholl HPN, Marin-Martinez S, Rosinés-Fonoll J, Suarez-Valero X, Reich M, Lange C, Egan C, Zweifel S, Tufail A, Spaide RF, Zarranz-Ventura J.

Retinal vessel volume reference database derived from volume-rendered optical coherence tomography angiography.

Sci Rep. 2024;14(1):2721.

Factor de impacto (2023): 3.8 Journal Citation Report (JCR)

Primer cuartil (25/134, MULTIDISCIPLINARY SCIENCES), JCR 2023

DOI: [10.1038/s41598-024-53000-8](https://doi.org/10.1038/s41598-024-53000-8)

PMID: [38302574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38302574/)

5. RESUM EN CATALÀ

Títol: Nous paràmetres vasculars de la retina en reconstruccions tridimensionals d'angiografia per tomografia de coherència òptica: Volum i Superfície vascular.

Introducció: L'angiografia per tomografia de coherència òptica (OCTA) és una tècnica avançada que permet la visualització del flux sanguini en la retina amb alta resolució i profunditat. Malgrat el seu ús generalitzat, el mètode estàndard de visualització emprat en l'actualitat és bidimensional (en face). No obstant això, la reconstrucció tridimensional de les imatges de OCTA permet modelar l'arquitectura dels vasos retinals en 3 dimensions, obrint la porta al desenvolupament de nous paràmetres vasculars tridimensionals.

Hipòtesi: És possible obtenir mesures objectives del volum i la superfície vascular dels vasos de la retina en reconstruccions tridimensionals generades a partir d'imatges d'angiografia per tomografia de coherència òptica en controls sans.

Objectius: L'objectiu principal d'aquesta Tesi és establir una base de dades normativa dels paràmetres superfície i volum vascular de la retina a partir de la reconstrucció tridimensional d'imatges de OCTA en individus sans. Els objectius secundaris són avaluar si existeix una relació entre les variables principals (superfície i volum vascular) i variables secundàries, d'una banda oculars (equivalent esfèric, longitud axial, millor agudes visual corregida) i per un altre sistèmiques (edat i sexe).

Mètodes: Es van realitzar reconstruccions tridimensionals de OCTA (3D-OCTA) en 203 ulls de 107 participants sans, processant cubs maculars de OCTA de 3×3 mm mitjançant tècniques de generació de volum, i es van mesurar les àrees de superfície i el volum vascular. Es va realitzar una anàlisi de correlació i una anàlisi del model lineal generalitzat (GLM) per a investigar els efectes del sexe, l'edat, l'equivalent esfèric, la longitud axial i l'agudes visual en l'àrea de superfície vascular i el volum vascular.

Resultats Principals: La mitjana de l'àrea de superfície total va ser de $54,53 \text{ mm}^2$, amb un rang de 27,03 a $88,7 \text{ mm}^2$. El volum vascular mig global va ser de $0,23 \pm 0,05 \text{ mm}^3$.

L'anàlisi del model GLM va revelar que únicament la longitud axial tenia un efecte destacable sobre tots dos paràmetres.

Conclusions: Aquest estudi representa la primera caracterització de l'àrea de superfície vascular i del volum vascular en una àmplia cohort d'individus sans utilitzant reconstruccions tridimensionals de OCTA. Les troballes proporcionen dades normatives valuoses que poden servir com a referència per a futures recerques en el camp de l'anatomia vascular de la retina i les malalties retinals.

Paraules clau: angiografia per tomografia de coherència òptica (OCTA), vasos retinals, imatge tridimensional, àrea de superfície vascular, volum vascular.

6. INTRODUCCIÓN

El ojo es un entorno vascular único. Debido a su tamaño, la mayoría de los vasos retinianos se consideran parte del sistema microvascular. Este último se compone de los vasos de menor calibre (con diámetros inferiores a 100 μm), (1) que forman redes de arteriolas, capilares y vénulas que regulan el flujo sanguíneo y la presión de perfusión para optimizar el suministro de solutos sanguíneos, como nutrientes y oxígeno, a los órganos, y al mismo tiempo eliminar los productos de desecho metabólicos. (2,3) Debido a sus características anatómicas, la retina es de los pocos tejidos que permite la observación directa y no invasiva de la microcirculación.

Esto es de suma importancia ya que las alteraciones en el sistema vascular de la retina pueden ser empleadas para la detección precoz de enfermedades vasculares sistémicas, como por ejemplo la diabetes y la hipertensión arterial, (4) que a su vez representan una de las principales causas de ceguera. De hecho, la retinopatía diabética se sitúa como la principal causa de ceguera prevenible en la población activa. (5)

Debido a la combinación de factores ambientales y estilos de vida, así como a un aumento de la esperanza de vida, la incidencia de estas enfermedades está en aumento, especialmente en países con un alto nivel económico. Por ejemplo, la prevalencia mundial de la ceguera como consecuencia de Diabetes Mellitus estandarizada por edad ha aumentado de 14,0% a 18,5% entre 1990 y 2020. (4,6)

Todo lo anterior subraya el valor que tiene el poder identificar las anomalías vasculares retinianas en sus etapas iniciales. No obstante, para poder detectar dichos cambios primero es imprescindible tener un buen conocimiento de la anatomía vascular retiniana y disponer de pruebas de imagen de alta calidad que permitan observar y cuantificar con precisión la microcirculación de la retina.

6.1 ANATOMÍA VASCULAR DE LA RETINA

La irrigación arterial de la retina proviene de la arteria oftálmica, que deriva de la porción intracraneal de la arteria carótida interna, que a su vez procede de la arteria carótida y esta de la arteria aorta. La primera rama de la arteria oftálmica es la arteria central de la retina (ACR), responsable directa de la irrigación de los dos tercios internos de la retina. La ACR es una arteria terminal y su oclusión da como resultado una pérdida casi total de la visión, excepto en los casos en los que se encuentra una arteria cilioretiniana (procedente de una arteria ciliar posterior), como ocurre aproximadamente en un 20% de la población. (1,7,8)

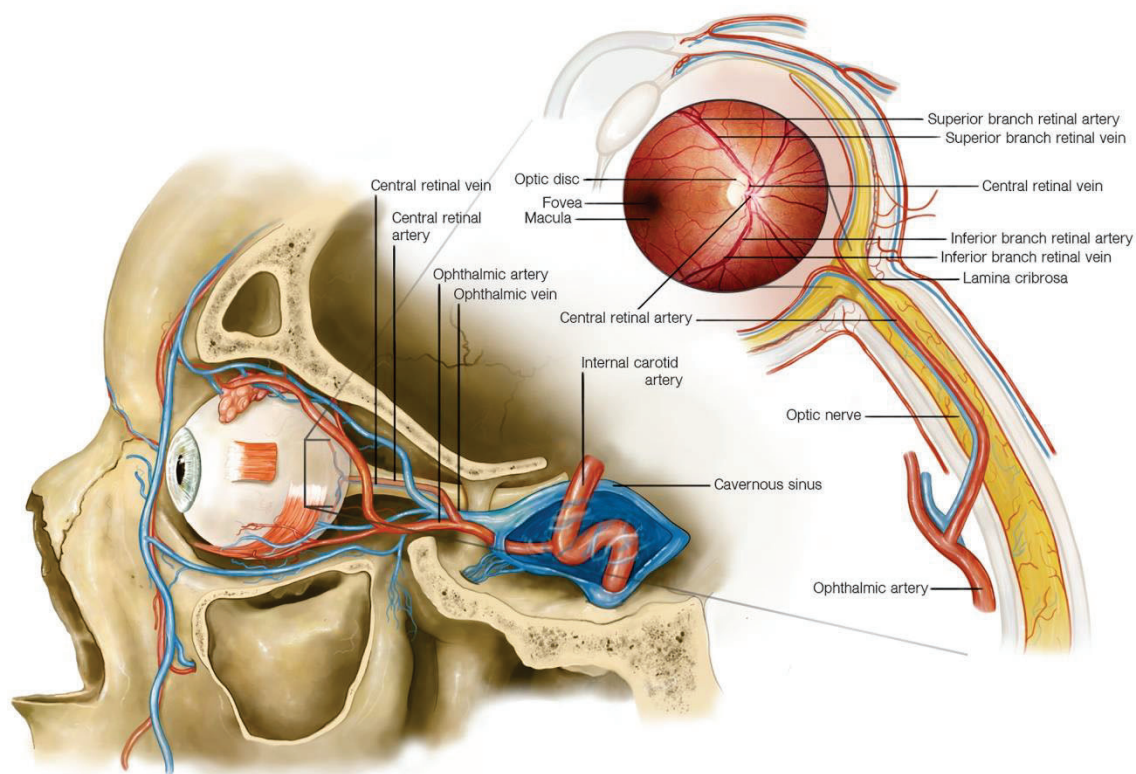


Figura 1. Anatomía del flujo sanguíneo ocular. Se aprecia el recorrido de la arteria y vena oftálmicas. La arteria oftálmica da lugar a la arteria central de la retina, que a su vez da las 4 ramas que suplen cada cuadrante de la retina. Central retinal vein: vena central de la retina; central retinal artery: arteria central de la retina; ophthalmic artery: arteria oftálmica; ophthalmic vein: vena oftálmica; internal carotid artery: arteria carótida interna; cavernous sinus: seno cavernoso; optic nerve: nervio óptico; optic disc: disco óptico; superior branch retinal artery/vein: rama superior arterial/venosa retiniana; inferior branch retinal artery/vein: rama inferior arterial/venosa retiniana. Imagen publicada en Scott IU, Campochiaro PA, Newman NJ, Biousse V. Retinal Vascular Occlusions. Lancet. 2020;396(10266):1927-1940. (9)

La ACR penetra la duramadre del nervio óptico unos 10-12mm posterior al globo ocular y viaja de forma oblicua a través del espacio subaracnoideo, suministrando pequeñas ramas meníngicas que irrigan la piamadre del nervio óptico durante su recorrido hacia adelante. En el disco, la ACR se bifurca creando cuatro ramas (arcadas) que suplen cada cuadrante de la retina. (1,7)

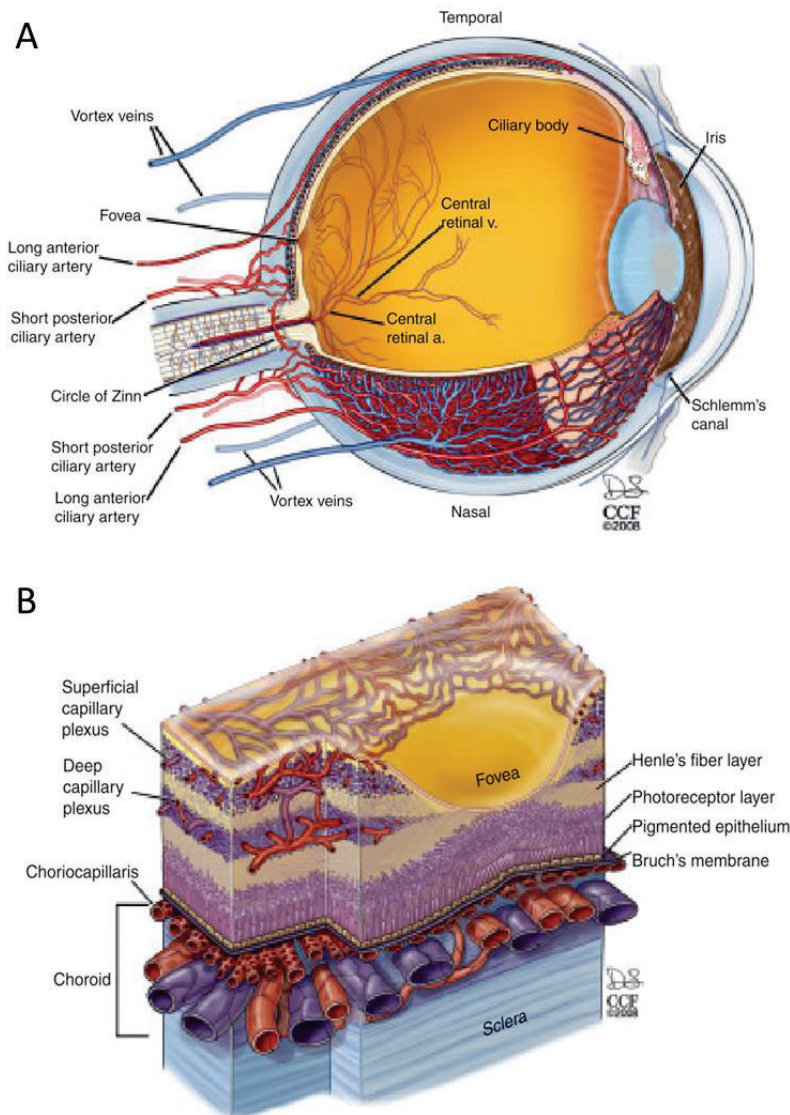


Figura 2. Circulación retiniana y coroidea. A: corte sagital, B: sección de la red vascular a nivel de la fovea. Vortex veins: venas vórtices; long anterior ciliary artery: arteria ciliar anterior larga; short posterior ciliary artery: arteria ciliar posterior corta; circle of Zinn: anillo de Zinn; Central retinal a.: arteria central de la retina; Central retinal v.: vena central de la retina; ciliary body: cuerpo ciliar; Schlemm's canal: canal de Schlemm. Superficial capillary plexus: plexo capilar superficial; Deep capillary plexus: plexo capilar profundo; choroid: coroides; sclera: esclera; Henle's fiber layer: capa de fibras de Henle; photoreceptor layer: capa de fotoreceptores; pigmented epithelium: epitelio pigmentado; Bruch's membrane: membrana de Bruch. Figura adaptada de Anand-Apte B, Hollyfield JG. Developmental anatomy of the retinal and choroidal vasculature. Encyclopedia of the Eye. 2010: 9-15. Dibujos de Dave Schumick. (10)

Las arcadas de la ACR discurren en la capa de fibras creando arteriolas que se distribuyen a través de las diferentes capas de los dos tercios internos de la retina – sin sobrepasar la capa nuclear interna -. Estas arteriolas carecen de anastomosis y dan lugar a una red capilar difusa (7) formada por hasta cuatro plexos capilares diferentes, dependiendo de la zona de la retina analizada. (1,11)

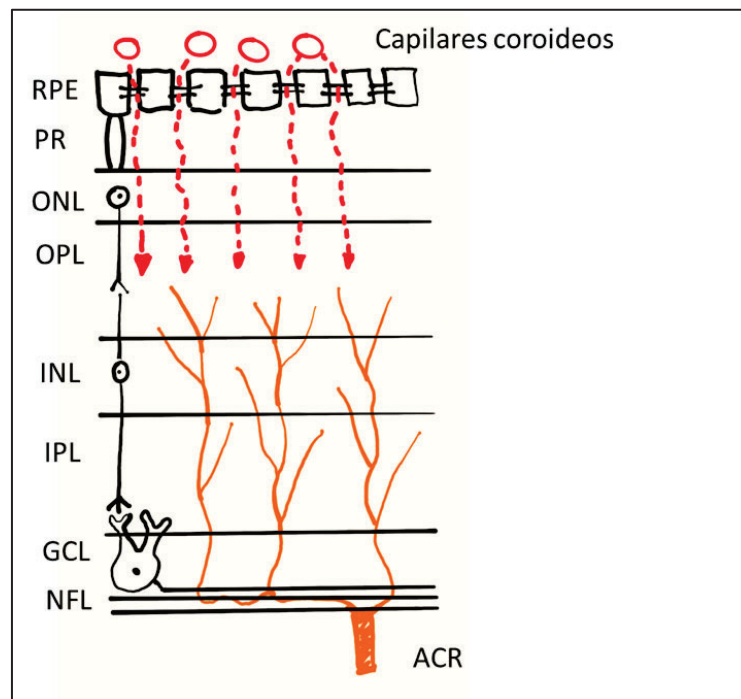


Figura 3. Anatomía vascular de la retina. Figura que ilustra el aporte sanguíneo retiniano. El tercio externo de la retina recibe nutrientes por difusión desde la circulación coroidea. Los dos tercios internos reciben nutrientes directamente de la ACR (arteria central de la retina). RPE: epitelio pigmentario de la retina; PR: capa de fotorreceptores; ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares; NFL: capa de fibras nerviosas. Imagen adaptada de Ferris J. Ocular Anatomy. En: Ferris J. Basic Sciences in Ophthalmology: A self assessment text. Segunda ed. London: BMJ Books; 1999. p. 1-66. (7)

El más superficial es el plexo capilar peripapilar radial (RPCP), que se distribuye de manera paralela a los axones de la capa de fibras nerviosas (a diferencia de los plexos vasculares más profundos, que tienen una configuración lobulillar). Su papel es importante para satisfacer la alta demanda metabólica de los axones no mielinizados. (1,11) El siguiente, el plexo vascular superficial (SVP), se encuentra en la capa de células ganglionares de la retina. Junto con el RPCP, forman el complejo vascular superficial (SVC), que está irrigado por la ACR. Hay dos redes capilares más profundas:

el plexo vascular intermedio (IVP), que se encuentra en la parte superior de la capa nuclear interna, y el plexo vascular profundo (DVP), que se encuentra en la parte inferior de la capa nuclear interna. Juntos, estos dos últimos plexos, forman el complejo vascular profundo (DVC), que es irrigado por anastomosis verticales desde la SVP pero también recibe soporte nutricional desde la coriocapilar. Cada uno de los 4 plexos tiene un patrón vascular ligeramente diferente. Por ejemplo, la SVP muestra una proyección más lineal desde la arteriola a la vénula, mientras que en la DVP es más compleja.

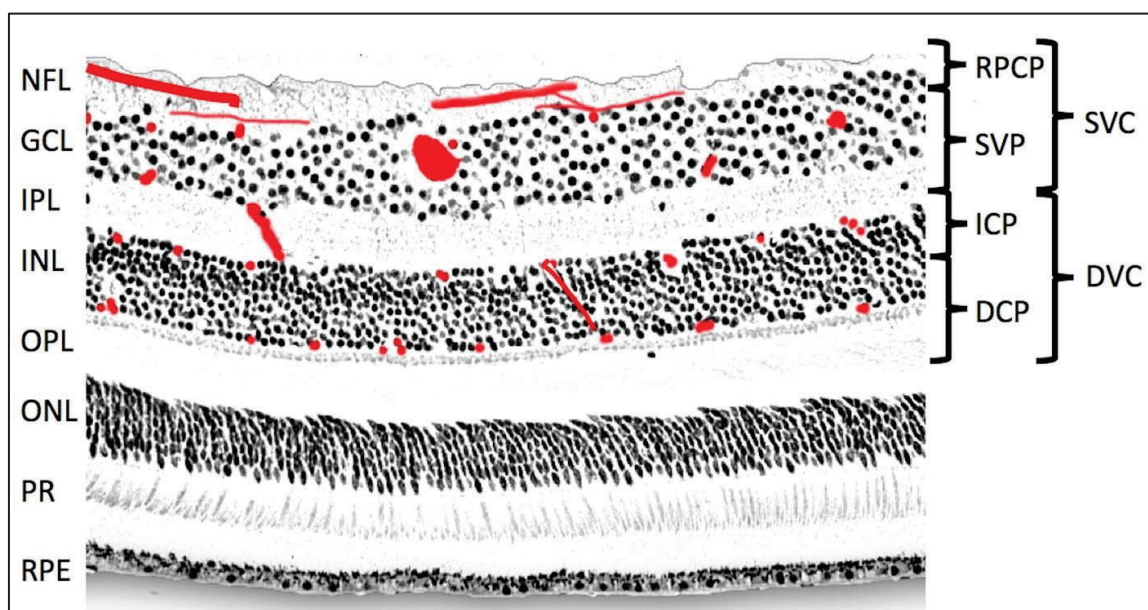


Figura 4. Capas vasculares de la retina. Esta figura muestra las capas anatómicas de la retina (NFL: capa de fibras nerviosas; GCL: capa de células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: capa nuclear externa; PR: fotoreceptores; RPE: epitelio pigmentario de la retina) y los plexos vasculares que las recorren (RPCP: plexo capilar peripapilar radial; SVP: plexo vascular superficial; ICP: plexo vascular intermedio o IVP, DCP: plexo vascular profundo o DVP). El SVP junto con el RPCP forman el complejo vascular superficial (SVC). El IVP y el DVP forman el complejo vascular profundo (DVC). Los capilares del RPCP discurren paralelos a los axones de la capa de fibras nerviosas, mientras que el resto de plexos tienen una disposición lobulillar. Imagen adaptada de la publicada en Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, Bailey ST, Wilson DJ, Jia Y, et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. Sci Reports 2017;7(1):1-11. (11)

Esta estratificación depende de la zona y del grosor total de la retina. De hecho, cerca de la fóvea se encuentra únicamente un único plexo capilar, mientras que en la fóvea no se encuentran capilares en la mayoría de individuos, creando lo que se denomina la

zona foveal avascular (FAZ). De la misma manera, en la retina periférica, donde las capas de la retina son más delgadas, se encuentra un único plexo capilar. La RPCP es más prominente cerca del nervio óptico, donde los axones son más numerosos y la capa de fibras nerviosas más gruesa. Así, cada plexo capilar está ubicado para brindar soporte a las capas de la retina con mayores demandas metabólicas.(1)

En cuanto al tercio externo de la retina, su irrigación proviene de la circulación coroidea. Esta última deriva de otra rama de la arteria oftálmica: las arterias ciliares posteriores, que se ramifican en las arterias ciliares posteriores largas que irrigan el ojo anterior y las arterias ciliares posteriores cortas que irrigan la coroides y, por difusión, el tercio externo de la retina.(1,7) La circulación coroidea se estructura de forma diferente a la retiniana. Se diferencian 3 capas. La más profunda es la capa de Haller, que contiene los vasos de mayor calibre. A nivel intermedio se encuentra la capa de Sattler, con los vasos de tamaño medio. La más superficial, adyacente al epitelio pigmentario de la retina, es la coriocapilar, una densa red de capilares que carecen de uniones estrechas. (1)

En cuanto al drenaje venoso, la sangre de la retina drena de las venas retinianas a la vena central de la retina, y la sangre de la coroides drena a través de las venas vorticosas. La vena central de la retina y las venas vorticosas superiores drenan a la vena oftálmica superior que entra al seno cavernoso. Las venas vorticosas inferiores drenan a la vena oftálmica inferior, que a su vez generalmente drena hacia la vena oftálmica superior, pero puede, sin embargo, entrar al seno cavernoso separadamente. El drenaje finalmente fluye hacia el sistema yugular. (1,7)

Como comentado anteriormente, excluyendo la arteria central de la retina y sus ramas principales que tienen más de 100 μm de diámetro, al igual que la vena central de la retina y sus principales contribuyentes, los vasos retinianos se componen mayoritariamente de densas redes de capilares que se encuentran dentro del rango de tamaño de la microcirculación. Esto tiene sentido ya que, como órgano sensitivo, el ojo es uno de los órganos con mayor demanda energética. (1)

6.2 FONDO DE OJO Y RETINOGRAFÍA

Existen numerosas técnicas de imagen en la actualidad para la visualización de la anatomía vascular retiniana. La fundoscopia es una prueba directa no invasiva que se puede realizar en cualquier consulta oftalmológica. Se precisa únicamente de una fuente de luz y una lente. Al igual que la retinografía, para la que en cambio se precisa de un retinógrafo, permite observar el nervio óptico y los vasos principales (arterias, arteriolas y venas), detectando las principales afecciones retinianas y otras enfermedades del nervio óptico (glaucoma, neuropatías ópticas, etc.). Por ejemplo, se puede observar el estrechamiento arteriolar típico de la hipertensión arterial, o la presencia de microaneurismas, hemorragias y exudados duros sugestivos de retinopatía diabética.(4) No obstante, estas técnicas no permiten observar los vasos de pequeño calibre ni los plexos capilares, que representan la mayoría de los vasos retinianos, por lo que aportan una información limitada sobre el estado vascular real de la retina.



Figura 5. Retinografía clásica de un ojo sano. Imagen original de la autora.

6.3 RETINOGRAFÍA DE CAMPO ULTRA AMPLIO (UWF)

La retinografía clásica captura imágenes de la retina, normalmente de 30º a 45º. Para el estudio de patologías vasculares como la retinopatía diabética, se puede realizar un montaje de siete retinografías (siete campos estándar del ETDRS) superpuestas, que en conjunto incluyen 75º de la retina, es decir, cubren aproximadamente un 30% de la superficie retiniana. Esto permite la visualización del polo posterior pero no de la periferia de la retina. Para superar este obstáculo, en los últimos años se ha desarrollado la retinografía de campo ultra amplio, que tiene la ventaja de capturar imágenes de 200º de la retina (aproximadamente un 80% de la superficie retiniana). Además tiene la ventaja de no requerir midriasis y de ver la calidad de sus imágenes menos afectada por opacidades de medios, como por ejemplo las cataratas. Esta técnica de imagen se ha demostrado superior a la retinografía clásica y al examen del fondo de ojo para categorizar patologías de la vascularización retiniana como la retinopatía diabética. (12–17) No obstante, sigue sin permitir la visualización de los vasos de pequeño tamaño ni los plexos capilares.

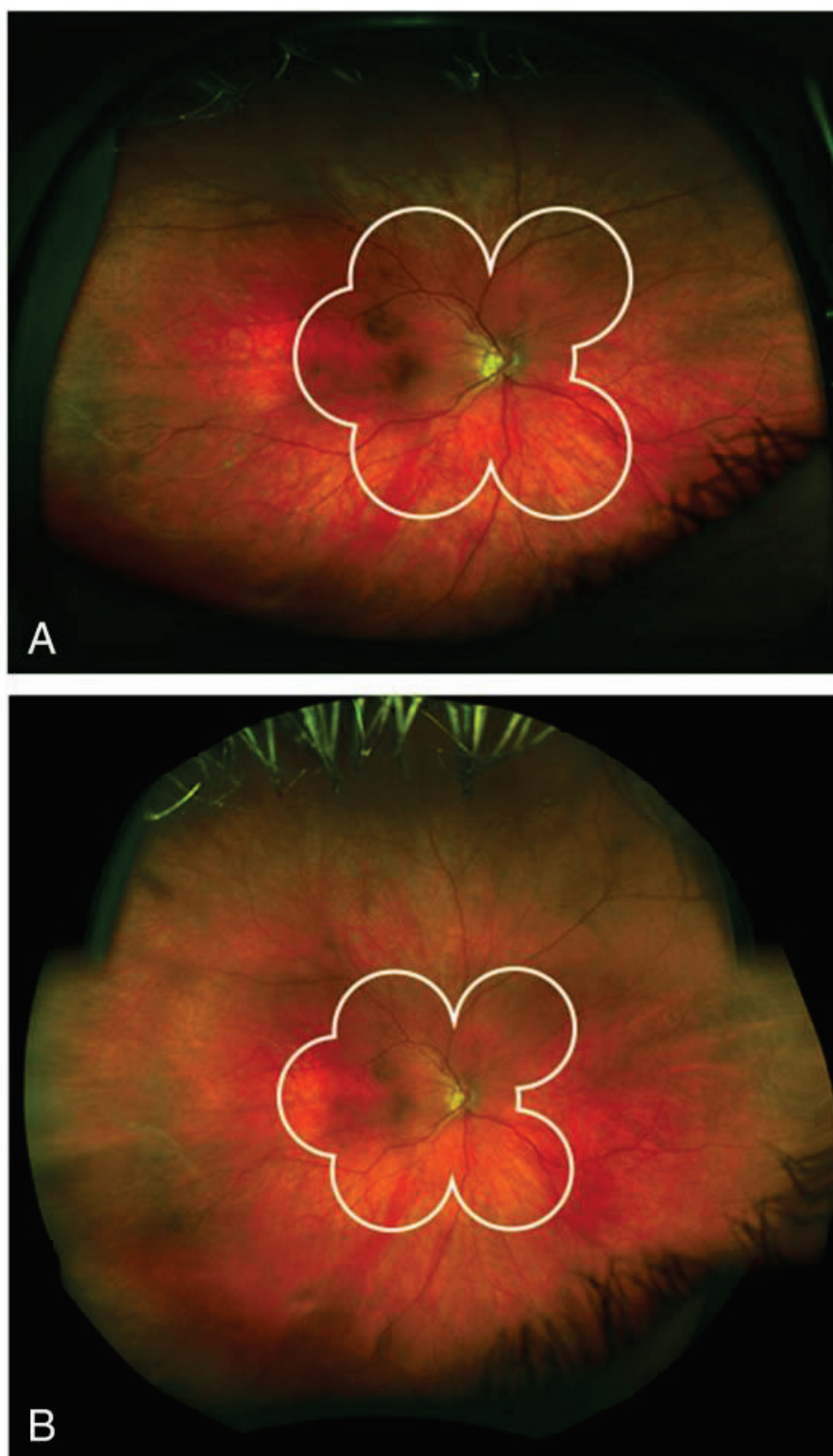


Figura 6. Comparación de cobertura de imágenes de retinografía de 7 campos ETDRS e imagen de campo amplio. (A) Cobertura de imágenes de 7 campos ETDRS en una imagen de campo amplio. (B) Imagen montada de la imagen central y la periferia superior, nasal, temporal e inferior, incluida la cobertura de imágenes de 7 campos ETDRS. Imagen publicada en Rasmussen ML, Broe R, Frydkjaer-Olsen U, Olsen BS, Mortensen HB, Peto T, et al. Comparison between Early Treatment Diabetic Retinopathy Study 7-field retinal photos and non-mydratic, mydratic and mydratic steered widefield scanning laser ophthalmoscopy for assessment of diabetic retinopathy. J Diabetes Complications. 2015;29(1):99-104. (15)

6.4 ANGIOGRAFÍA FLUORESCEÍNICA (AGF)

Introducida por Novotny y Alvis en 1961 [14], la angiografía fluoresceínica (AGF) es una técnica de imagen bidimensional considerada el “*gold-standard*” para la obtención de imágenes de los vasos retinianos durante décadas. (18,19) Consiste en la administración de fluoresceína, generalmente intravenosa, para después capturar imágenes por autofluorescencia de la fluoresceína presente en la circulación retiniana y coroidea. Así, permite la visualización de los vasos retinianos, el flujo sanguíneo y la extravasación (o “fuga”) de fluoresceína que se produce cuando tiene lugar una ruptura de la barrera hematorretiniana, estableciendo patrones característicos de muchas afecciones de la retina, en una misma prueba.(11,20,21) Además, se puede asociar con herramientas y softwares de procesamiento avanzado de imágenes, para delimitar, por ejemplo, las áreas de no perfusión macular (Figura 7). Contrariamente a las angiografías clásicas, no precisa de contraste yodado ni de radiación.

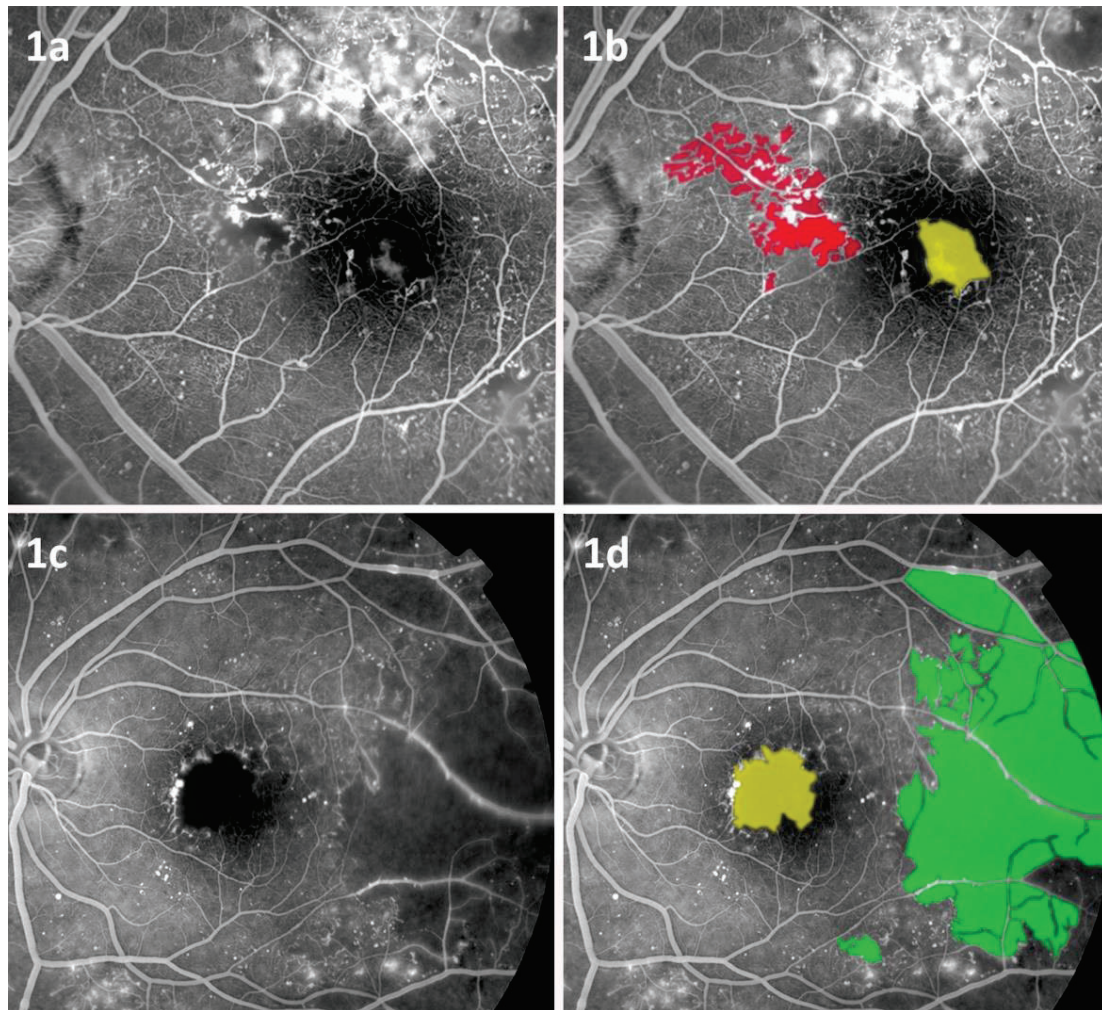


Figura 7. Angiografía fluoresceínica y softwares de procesamiento de imágenes. 1a: fase precoz, demostrando área de no perfusión separada y no contigua a región de la zona avascular foveal (FAZ). 1b: Misma imagen con zona de no perfusión resaltada en rojo y FAZ agrandada en amarillo. 1c: fase precoz demostrando área de no perfusión separada y no contigua a la FAZ. 1d: Misma imagen con zona de no perfusión resaltada en amarillo y FAZ agrandada en amarillo. Adaptado de Sim DA, Keane PA, Zarranz-Ventura J, Fung S, Powner MB, Platteau E, et al. The effects of macular ischemia on visual acuity in diabetic retinopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(3):2353-60. (22)

No obstante, se trata de una prueba lenta, invasiva y con efectos adversos potencialmente graves. (18,19) Asimismo, tiene una resolución limitada y no permite ver el plexo capilar peripapilar radial (RPCP) ni los plexos capilares profundos (IVP y DVP). Por lo tanto, no permite visualizar adecuadamente el flujo sanguíneo retiniano, sobre todo a nivel microcapilar. (11,18)

6.5 TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA (OCT) ESTRUCTURAL

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una técnica de imagen por interferometría, no invasiva y rápida que proporciona imágenes transversales de alta resolución de la retina, basándose en las diferencias entre las propiedades ópticas de los tejidos.(20,23) Actualmente la OCT se ha convertido en la prueba de imagen más utilizada en oftalmología para el estudio de enfermedades de la retina y del nervio óptico. De hecho, es muy útil en el diagnóstico y seguimiento de patologías como la degeneración macular asociada a la edad y la retinopatía diabética ya que permite evaluar cuantitativamente el grosor de la retina y evaluar cambios anatómicos como la presencia o no de fluido intrarretiniano y/o subretiniano. (11,24)

Desde su introducción en 1991 con la tecnología *time-domain* (TD-OCT), se han ido incorporando mejoras. Primeramente, la aparición del OCT *spectral-domain* (SD-OCT) permitió un incremento de la velocidad (de 400 escáneres-A por segundo con TD-OCT a 20.000-40.000 escáneres-A por segundo con SD-OCT), así como una mejoría significativa en la resolución de la imagen y el campo de visión, a la vez que una disminución de los artefactos de movimiento. Más recientemente, se ha incorporado el *swept-source* OCT (SS-OCT) que permite una velocidad de escaneo todavía más rápida (100.000-400.000 escáneres-A por segundo), lo que hace posible obtener imágenes con una mejor resolución espacial y un incremento en el campo de visión, además de una mejor visualización de estructuras profundas debido a la mayor penetración en los tejidos retinianos (al disponer de un láser de longitud de onda mayor). (24,25)

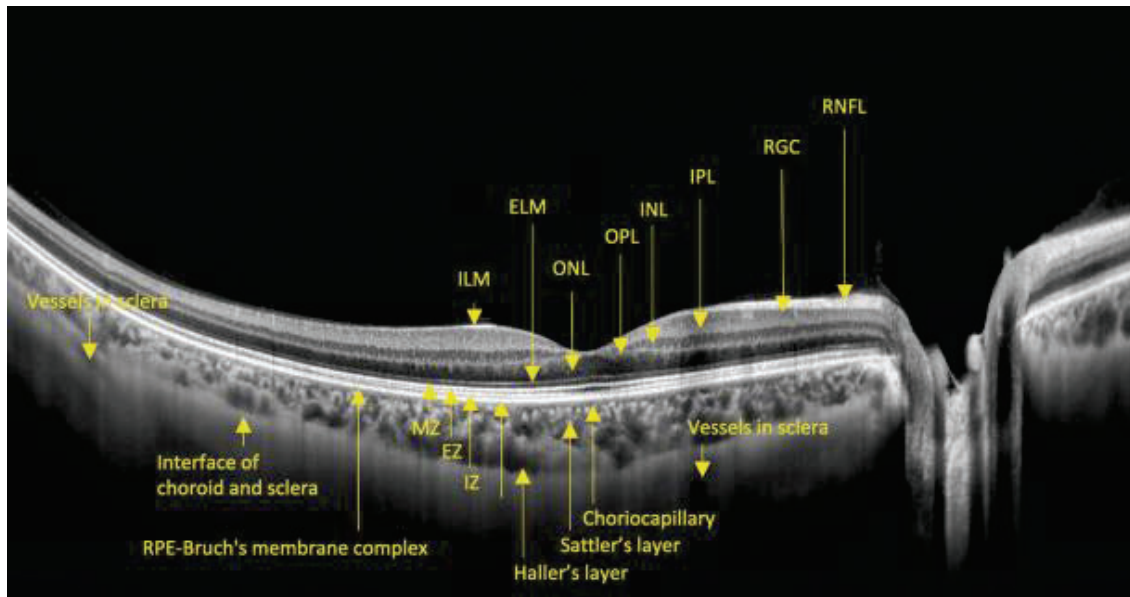


Figura 8. OCT Swept-Source y estructuras visualizables. Escaneo macular mediante OCT swept-source en un ojo sano. Presenta una alta resolución de las estructuras y una mejor visualización de la coroides. Se señalan desde interno a externo: membrana limitante interna (ILM), capa de fibras del nervio óptico (RNFL), células ganglionares retinianas (RGC), capa plexiforme interna (IPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear externa (ONL), membrana limitante externa (ELM), zona mioide (MZ), zona elipsoides (EZ), zona interdigitación (IZ), complejo epitelio pigmentado de la retina (RPE) - membrana de Bruch, coriocapilaris, capa de Sattler, capa de Haller, interfaz coroides y esclera, vaso escleral. Imagen publicada en Yang J, Wang E, Chen Y. Swept-Source OCT of Normal Eyes. Atlas Swept Source OCT OCT Angiogr. 2023;33-54. (26)

A pesar de todas estas ventajas, y aunque la OCT posibilita un buen estudio de las estructuras retinianas estáticas, no permite una buena visualización la microcirculación retiniana.

6.6 ANGIOGRAFÍA POR TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA (OCTA)

La angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCTA) es una técnica basada en la OCT que utiliza como método de contraste la variación de señal causada por las partículas en movimiento (en este caso, los eritrocitos), permitiendo la visualización del flujo sanguíneo en la retina. En otras palabras, permite el estudio de la microcirculación retiniana. De igual forma que el OCT, y contrariamente a la AGF, se trata de una prueba no invasiva y rápida que proporciona imágenes de alta resolución, sin necesidad de contraste ni colorante intravenoso. Además, su alta resolución permite la evaluación de todos los plexos capilares retinianos en sus distintos planos de profundidad. (20,24,27)

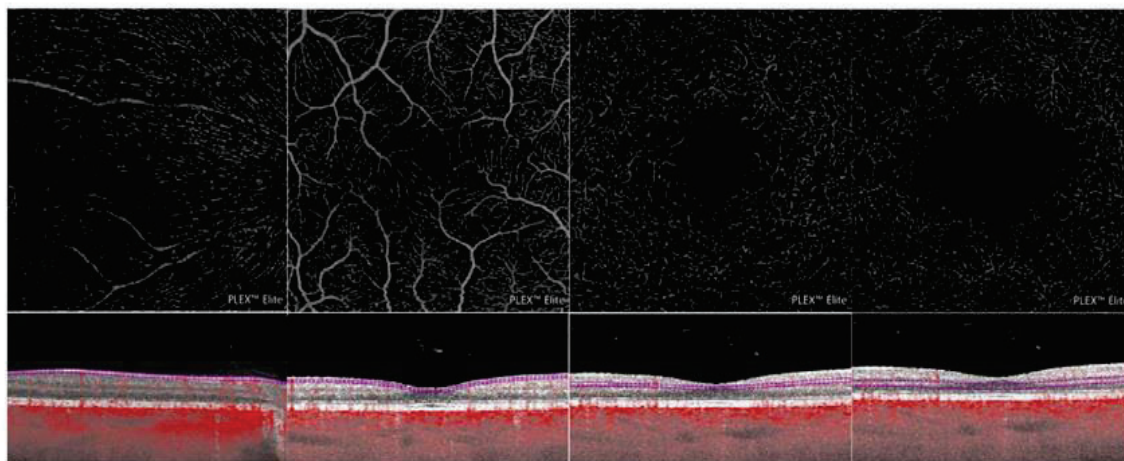


Figura 9. Plexos capilares visibles en imágenes de angiografía por tomografía de coherencia óptica. Imagen de angiografía por tomografía de coherencia óptica mostrando 4 plexos capilares morfológicamente diferentes en el haz papilomacular. La primera imagen muestra el plexo capilar peripapilar radial (RPCP) localizado en la capa de fibras nerviosas. La segunda imagen muestra el plexo vascular superficial en el 80% interno de la capa de células ganglionares (excluyendo la capa de fibras nerviosas). El plexo capilar intermedio se encuentra entre el 20% externo de la capa de células ganglionares y la parte interna de la capa nuclear interna (tercera imagen). Por último, el plexo capilar profundo se encuentra entre el 50% externo de la capa nuclear interna y la capa plexiforme externa (cuarta imagen). Imagen publicada en Spaide RF, Fujimoto JG, Waheed NK, Sadda SR, Staurengi G. Optical coherence tomography angiography. Prog Retin Eye Res. 2018;64:1-55. (8)

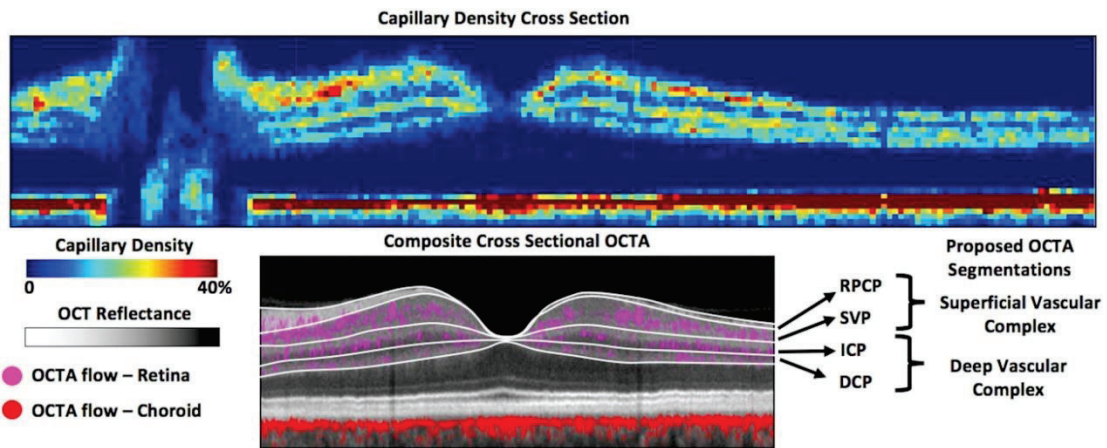


Figura 10. Densidad capilar y plexos capilares visibles con OCTA. Imagen obtenida a partir de OCTA donde se observan tres capas de densidad capilar concentrada (capas superiores de la imagen superior): complejo vascular superior, plexo capilar intermedio y plexo capilar profundo. Se observa una capa de alta densidad capilar en la coriocapilar (capa inferior). Los límites de segmentación propuestos se muestran en la imagen inferior (líneas blancas) con las correspondientes capas estructurales de OCT. (OCT = tomografía de coherencia óptica, RPCP = plexo capilar peripapilar radial, SVP = plexo vascular superficial, ICP = plexo capilar intermedio, DCP = plexo capilar profundo, GCC = complejo de células ganglionares, OPL = capa plexiforme externa, RPE = epitelio pigmentario de la retina). Imagen publicada en Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, Bailey ST, Wilson DJ, Jia Y, et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. Sci Reports 2017;7(1):1-11. (11)

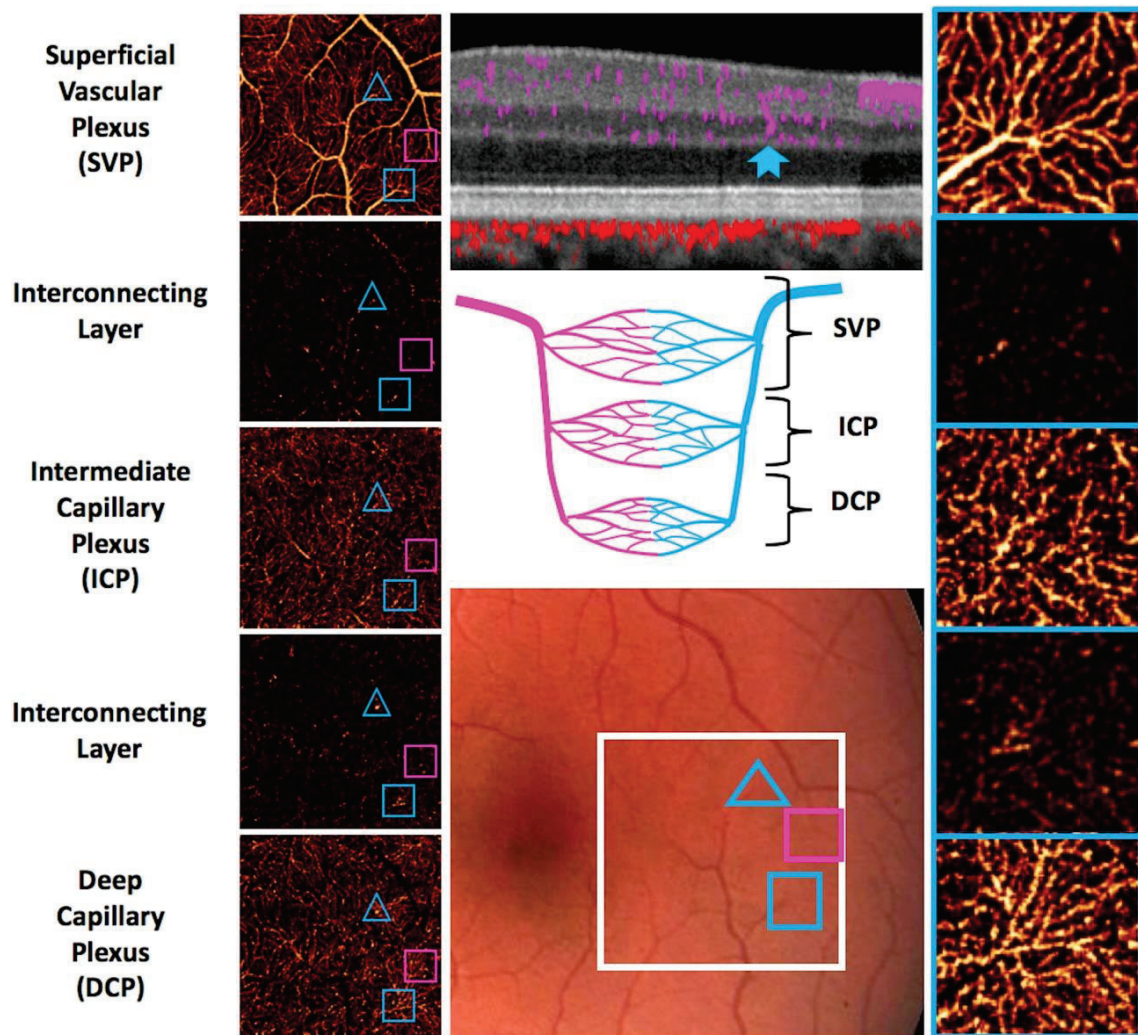


Figura 11. Relaciones anatómicas entre los sistemas arterial y venoso y los plexos capilares a partir de la combinación de imágenes de OCTA y retinografía. La fotografía en color del fondo de ojo (imagen inferior central) muestra la región de escaneo de 2×2 mm (cuadrado blanco). Los OCTA frontales (imágenes izquierdas) están dispuestos desde el más superficial en la parte superior hasta el más profundo en la parte inferior. Los triángulos azules encierran una vénula (identificada en la fotografía en color del fondo de ojo) que se puede ver en la sección transversal del OCT (imagen superior central) y que atraviesa desde el SVP al DCP (flecha azul). Los cuadrados de color rosa muestran una arteriola que se puede ver en SVP, ICP, DCP y la capa de interconexión entre ICP y DCP. Los cuadrados azules muestran una vénula que se ve claramente en todas las imágenes de OCTA magnificadas (imágenes de la derecha). Esta vénula da lugar a una red de capilares en los 3 plexos. El dibujo central representa las relaciones anatómicas entre los sistemas arterial y venoso en los tres plexos vasculares. Imagen publicada en Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, Bailey ST, Wilson DJ, Jia Y, et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. Sci Reports 2017;7(1):1-11. (11)

OCTA	AGF
No invasiva, no se precisa contraste	Invasiva, precisa contraste. Riesgo de anafilaxis
Rápida	Requiere mucho tiempo
Interpretación puede requerir más tiempo	Visualización de imágenes puede ser más rápida
Proporciona información sobre la profundidad tanto de la circulación retiniana como coroidea	No proporciona información sobre las capas individuales
Capaz de segmentar varias capas	Retina fotografiada en su totalidad
Artefactos puede afectar interpretación	Menos artefactos
Detecta el flujo pero no la extravasación	Detecta extravasación y actividad
Alta resolución, hasta capilares retinianos	Menor resolución, capaz de visualizar vasos retinianos de gran tamaño pero no capilares
Campo de visión pequeño	Campo de visión amplio (wide-field) disponible
No función estereoscópica	Opción estereoscópica
No función de video dinámico	Opción función video

Tabla 1. Comparación entre angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCTA) y angiografía fluoresceínica (AGF). Tabla traducida y adaptada de Tan ACS, Tan GS, Denniston AK, Keane PA, Ang M, Milea D, et al. An overview of the clinical applications of optical coherence tomography angiography. Eye (Lond). 2018;32(2):262-286. (28)

Desde su salida al mercado en 2014, la OCTA está revolucionando nuestros conocimientos sobre la anatomía y fisiología vascular ocular. (8,24) No solo nos ofrece imágenes de alta calidad que permiten valorar mejor parámetros cualitativos, sino que además los datos de estas imágenes se pueden procesar mediante softwares con el objetivo de proporcionar marcadores cuantitativos de la microcirculación retiniana. (8)

De hecho, a día de hoy, los distintos softwares comerciales incorporados en los dispositivos de OCTA, que varían en función del dispositivo del que se disponga, procesan generalmente los parámetros cuantitativos más comunes, entre los que se encuentran: Densidad Vascular (DV), Densidad de Perfusión (DP) y los derivados de la

zona avascular foveal (FAZ) (área, perímetro y circularidad). (Figura 8) Además, las imágenes de OCTA se pueden procesar con softwares de investigación externos, generando multitud de nuevos parámetros (tabla 1). (29)

PARÁMETRO CUANTITATIVO		DESCRIPCIÓN
Complejo vascular superficial y profundo		
1	Área de la zona avascular foveal (FAZ A)	Área de avascularidad en la región foveal circunscrita por los complejos vasculares retinianos
2	Índice de Circularidad (FAZ CI) e Índice de Acircularidad de la FAZ	Caracterización de la forma de FAZ mediante la cuantificación de su circularidad
3	Dimensión Fractal (FD)	Describe cómo una imagen ocupa un espacio al hacer zoom a una escala más pequeña
4	Densidad Esquelética (SD)	La longitud absoluta del vaso en toda la exploración
5	Densidad vascular (VD) o densidad de perfusión	Relación entre el total de píxeles en la vasculatura y el total de píxeles en el escaneo
6	Índice de diámetro vascular (VDI)	Diámetro promedio del vaso en el escáner
7	Tortuosidad vascular	Tortuosidad de los vasos en el escáner
8	Mapa de Contorno	Mapa de probabilidad de la vasculatura creado utilizando las dimensiones fractales normalizadas locales
9	Análisis de punto de ramificación	Describe el patrón de ramificación de la vasculatura OCTA mediante análisis geométrico.
10	Índice de Flujo	Señal de flujo promedio en la región de interés
Coriocapilar y coroides		
1	Área de Déficit de Flujo (FD)	Describe el área total ocupada por déficits de flujo o vacíos de flujo en la vasculatura coroidea
2	Número de déficit de flujo	Describe el número total de FDs
3	Densidad de Déficit de Flujo (FDD)	Relación entre el área ocupada por los déficits de flujo y la de todo el escaneo
4	Tamaño medio del déficit de flujo (MFDS)	Tamaño promedio de los déficits de flujo individuales en el escáner
5	Índice de relación de aspecto del déficit de flujo (FDARI)	Caracterización de la forma y la irregularidad de los déficits de flujo en el escáner
6	Índice de complejidad del déficit de flujo (FDCI)	Cuantifica la complejidad morfológica de los déficits de flujo
7	Índice de flujo promedio global (GAFI)	Promedio del flujo general a lo largo del escáner
8	Índice de fluctuación global	Desviación estándar de la intensidad de la señal en el escáner

Tabla 2. Resumen de parámetros cuantitativos medidos en angiografía por tomografía de coherencia óptica. Tabla adaptada y traducida de Kalra G, Zarranz-Ventura J, Chahal R, Bernal-Morales C, Lupidi M, Chhablani J. Optical coherence tomography (OCT) angiolytics: a review of OCT angiography quantitative biomarkers. *Surv Ophthalmol.* 2022;67(4):1118-34. (29)

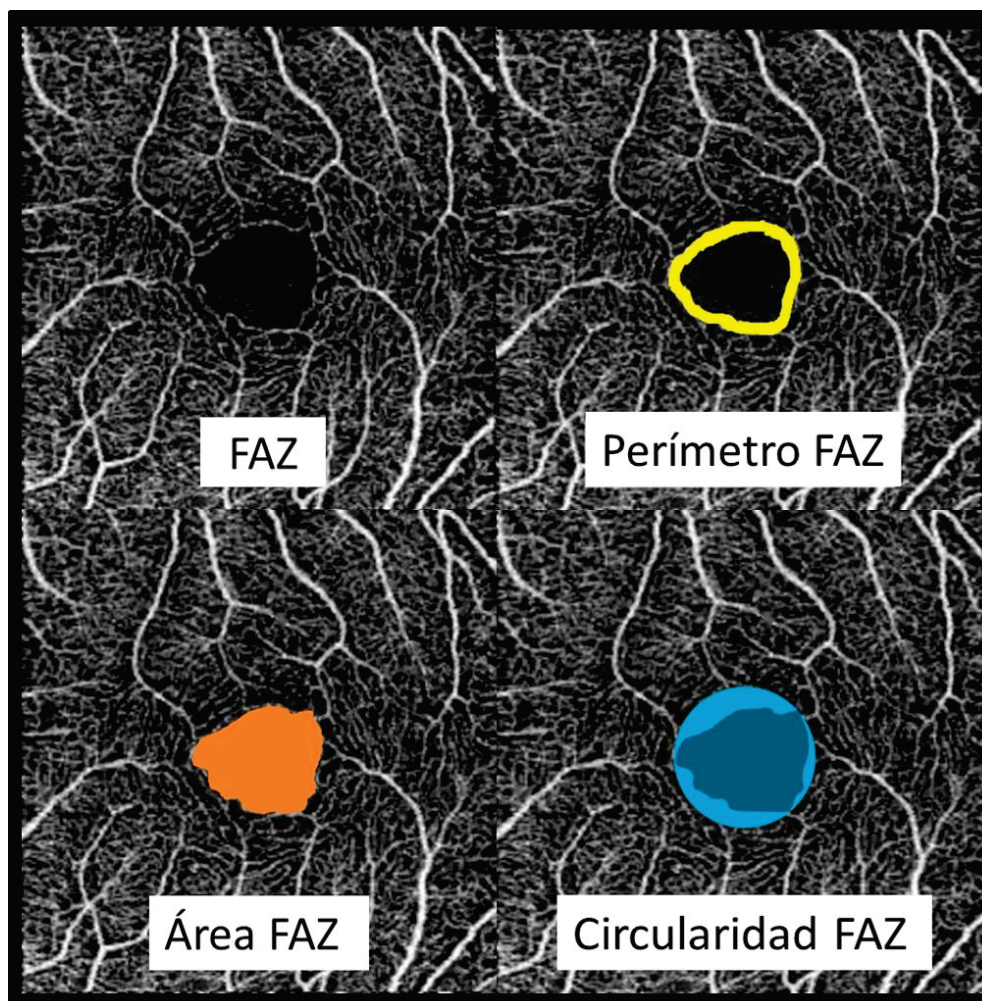


Figura 12. Parámetros derivados de la zona avascular foveal (FAZ). Captura de OCTA macular 3x3 mm² con representación visual de los 3 parámetros cuantitativos medibles por software de la zona avascular foveal (FAZ): en amarillo el perímetro, en naranja el área y en azul la circularidad. Imagen original de la autora.

6.6.1 OCTA: Estudio de enfermedades oculares

Numerosos estudios han demostrado relaciones entre los parámetros cuantitativos obtenidos gracias a OCTA y patologías vasculares retinianas. De hecho, se ha descrito un aumento del área FAZ tanto en el plexo capilar superficial como en el profundo en pacientes con obstrucción de vena central de la retina. (30) También se ha reportado una reducción significativa en la dimensión fractal (FD) y la densidad esquelética (SD) en ojos con oclusión venosa de la retina, en comparación con controles. (31) En pacientes con diabetes mellitus, se ha asociado la severidad de la retinopatía diabética con un aumento del área y del perímetro FAZ, una disminución de la circularidad FAZ, una densidad vascular (VD) y dimensión fractal (FD) más bajas, así como con un índice de diámetro del vaso (VDI) aumentado. (29,32,33)

La importancia de los parámetros cuantitativos que se obtienen del OCTA radica no solo en su capacidad para detectar cambios en enfermedades oculares, sino también en su capacidad de predecirlas. En efecto, algunas publicaciones empiezan a sugerir algunos de estos parámetros como potenciales biomarcadores de enfermedad microvascular. Es el caso del VDI, que se ha insinuado como probable marcador biológico de complicaciones microvasculares precoces en pacientes con RD. (29,34,35)

6.6.2 OCTA: Estudio de enfermedades vasculares sistémicas

Cabe destacar que los parámetros cuantitativos obtenidos de OCTA no solo permiten valorar la microcirculación retiniana, sino que además han demostrado relaciones con patologías sistémicas. Resulta lógico si se tiene en cuenta que los cambios en los vasos retinianos reflejan diversas respuestas fisiopatológicas subclínicas a insultos como la inflamación, hipoxia y disfunción endotelial, que se producen no solo en patologías vasculares retinianas sino también sistémicas. Es decir, los cambios en la microcirculación retiniana son un espejo a los producidos en el resto del cuerpo. Por este motivo, el OCTA puede aportar información sobre cambios microvasculares pre-

clínicos en enfermedades como la hipertensión arterial, accidentes cerebrovasculares o enfermedades coronarias, entre otras. (34,36)

Por ejemplo, en un meta-análisis publicado en 2021 sobre la aplicación de OCTA en el estudio de la hipertensión arterial (36), se observó que esta última se asocia significativamente con una menor densidad vascular en los plexos capilares superficial y profundo, y una mayor área de la FAZ.

Asimismo, se ha descrito que el OCTA permite visualizar cambios cuantificables en la microcirculación retiniana de pacientes con accidente cerebrovascular isquémico (ACVI), comparando con controles sanos, que pueden ser de utilidad en la detección precoz y coste-eficiente de esta patología. Específicamente, se ha observado una disminución de la densidad vascular (VD) en el plexo capilar profundo (DVC) en pacientes con ACVI. Contrariamente, en el plexo vascular superficial (SVC) esta pérdida es más variable, por lo que se ha postulado la disminución de VD en el SVC como un predictor de gravedad. (37)

En cuanto a las enfermedades coronarias (EC), un reciente meta-análisis muestra que, a pesar de la heterogeneidad de los estudios encontrados en la literatura, se produce una disminución en la densidad vascular (VD) en todas las regiones maculares pero especialmente en el plexo capilar superficial (SVC), un adelgazamiento considerable de las capas retinianas y un aumento significativo en el área de la FAZ en pacientes con EC respecto a los controles sanos. (38)

6.6.3 OCTA y Oculómica

Teniendo en cuenta que la retina es la ventana a la microcirculación sistémica y que el OCTA permite visualizar su circulación microvascular de forma directa y no invasiva, esta prueba de imagen brinda una oportunidad única para la caracterización de enfermedades sistémicas. De hecho es, junto con la retinografía y la OCT, una de las pruebas impulsoras de la Oculómica, una disciplina emergente en los últimos años que

trata de identificar biomarcadores de patologías sistémicas a partir de parámetros oculares, y que está revolucionando el mundo científico actual. (39–42)

Indiscutiblemente, la Oculómica ha contribuido a la identificación de biomarcadores retinianos para múltiples patologías sistémicas, entre las que se encuentran no solamente enfermedades vasculares sino también neurológicas, psiquiátricas, hematológicas, nutricionales, autoinmunes, infecciosas y renales, entre otras. (41,43,44)

Para poder reconocer los cambios que se producen en la retina en las diferentes patologías, y así poder establecer biomarcadores, es necesario primero un estudio minucioso de esta en personas sanas. Esto refleja la especial importancia que tiene el seguir investigando para encontrar métodos para obtener más información, de mejor calidad y fiabilidad de las imágenes que se obtienen de la retina en pruebas de imagen tan útiles como la OCTA.

6.7 ANGIOGRAFÍA POR TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA TRIDIMENSIONAL (3D-OCTA)

6.7.1 2D-OCTA vs. 3D-OCTA

A pesar de que la OCTA proporciona información tridimensional, la mayoría de los instrumentos comerciales ofrecen una vista plana (bidimensional o “*en-face*”) de un solo píxel de espesor de capas seleccionadas de la retina. Esta representación es el método de visualización más utilizado actualmente tanto para la práctica clínica como para la investigación. (18,27,28,45,46) Aunque esta simplificación podía tener sentido en su momento desde un punto de vista práctico, aportando un equilibrio entre la cantidad de información que nos brinda la OCTA y las capacidades de visualización, lo cierto es que limita considerablemente la visualización de los datos volumétricos reales. En efecto, dado que los vasos sanguíneos son de por sí estructuras tridimensionales, representarlos de manera bidimensional puede no capturar

adecuadamente su curso ni interacciones. Por ejemplo, debido al aplanamiento del volumen que tiene lugar en las imágenes *en face*, es posible que no se obtengan imágenes de los vasos suprayacentes o subyacentes a la zona segmentada, provocando la subestimación de la perfusión tisular. Además, la representación bidimensional fusiona la información del flujo entre vasos, por lo que dos vasos superpuestos (pero separados en el espacio) que divergen pueden parecer idénticos a un solo vaso que se bifurca. También puede parecer que vasos que no están relacionados se anastomosan. Todo esto provoca una mala visualización del flujo real y puede llevar a errores de interpretación debido a segmentaciones incorrectas de capas específicas de la retina. (8,18,46)

La representación tridimensional de los datos de OCTA (3D-OCTA) es una prometedora área de investigación con el potencial de resolver muchas de estas limitaciones. La representación 3D-OCTA evita el aplanamiento de los subvolúmenes de tejido y no depende de la segmentación de capas, permitiendo una visualización más completa de todas las capas de flujo en la retina. Además, posibilita la manipulación de los datos en los 3 ejes de rotación, incluso la impresión tridimensional (3D) de mapas de flujo vascular retiniano.(47) En otras palabras, comparado con el método actual de visualización bidimensional (2D-OCTA), la 3D-OCTA permite modelar de manera aún más adecuada la arquitectura de los vasos retinianos, comprendiendo mejor su interrelación espacial y el flujo retiniano. (8,46–48)

Aunque todavía no se ha implementado en la mayoría de los OCTA comercializados, el 3D-OCTA ha demostrado ser útil en la evaluación de casos aislados de patologías retinianas como la telangiectasia macular tipo 2, Enfermedad de Stargardt, oclusión de vena retiniana y retinopatía diabética. (47–52). Por ejemplo, gracias a la visualización tridimensional de OCTA se ha podido observar que el edema macular quístico secundario a patologías vasculares retinianas (como oclusión de vena retiniana y retinopatía diabética) se produce en las zonas con ausencia de flujo en el plexo vascular profundo. (51) Analizar las relaciones entre anomalías retinianas y la anatomía vascular, resulta relativamente sencillo con 3D-OCTA, mientras que realizar la misma evaluación con 2D-OCTA sería bastante complicado. (8,27)

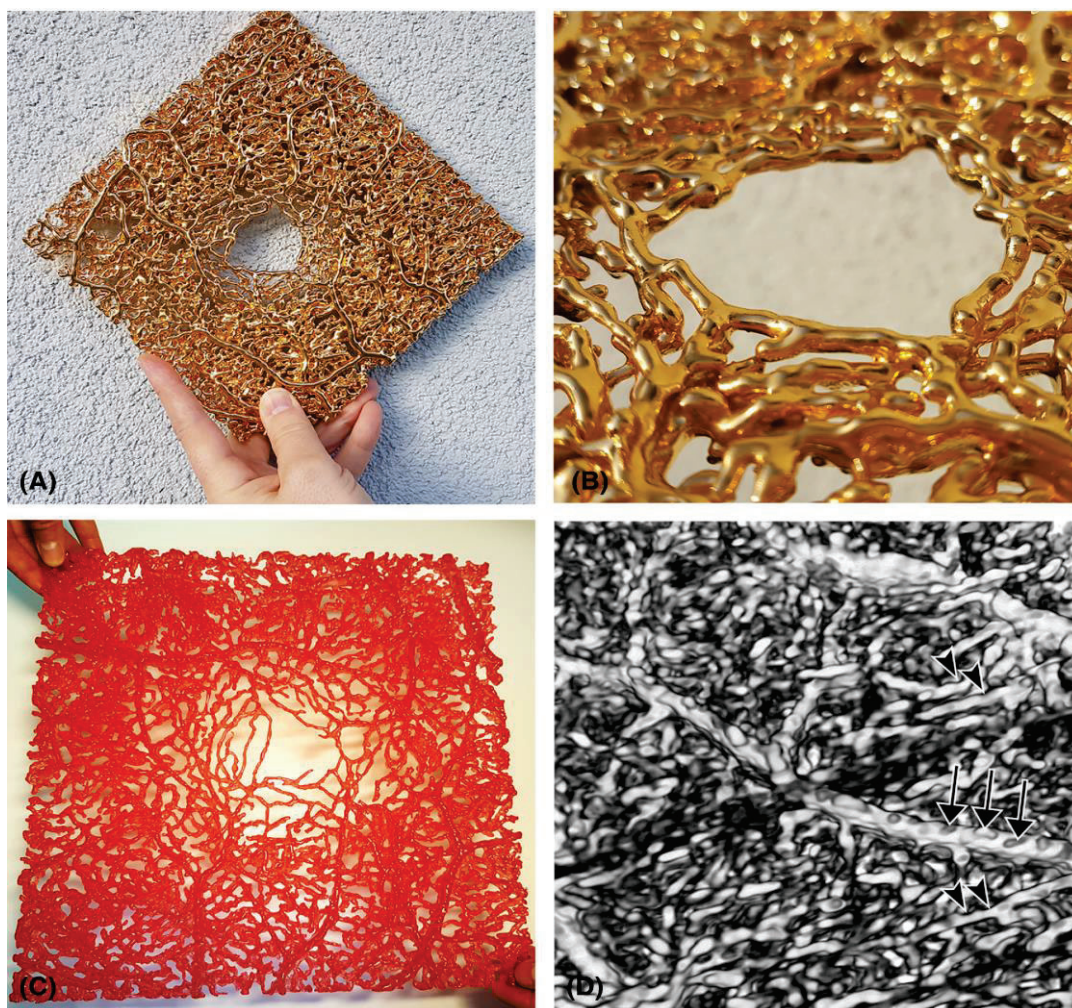


Figura 13. Impresión tridimensional (3D) de mapas de flujo vascular retiniano a partir de reconstrucciones tridimensionales de OCTA. (A) Impresión 3D de la vista frontal de una OCTA de una retina sana. La réplica del vaso retiniano se imprimió en resina y se cubrió con oro de 24 quilates (tamaño 200 × 200 × 15 mm). (B) Primer plano en vista frontal del mismo modelo que en (A) de una zona avascular foveolar normal (FAZ) de una OCTA impresa en 3D. La extensión exacta de la FAZ se puede delinear con precisión mediante impresión 3D. (C) Impresión 3D de OCTA de una retina sana con resina roja transparente (300 × 300 × 28 mm). (D) La representación del volumen OCTA en 3D muestra protuberancias de señal de diferentes tamaños y formas ("verrugas OCTA"; flechas negras) y pequeños defectos en la visualización del flujo como pequeñas abolladuras (puntas de flecha negras). Imagen publicada en Koustenis A, Harris A, Gross J, Januleviciene I, Shah A, Siesky B. Optical coherence tomography angiography: an overview of the technology and an assessment of applications for clinical research. Br J Ophthalmol. 2017;101(1):16-20. [45]

6.7.2 3D-OCTA: parámetros cuantitativos

De la misma manera que el 2D-OCTA, 3D-OCTA nos permite obtener parámetros cuantitativos, en este caso tridimensionales. Maloca et al (27) fueron los primeros en desarrollar y publicar, en 2020, un método para medir el área de superficie y el volumen vascular total de los vasos retinianos a partir de representaciones tridimensionales de OCTA. En el mismo estudio piloto, analizaron también los parámetros de esfericidad y cilindridad. La reproducibilidad del método fue buena. En este estudio piloto se analizaron estos parámetros derivados de 3D-OCTA en sanos y en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa, apreciándose diferencias significativas entre los dos grupos. No obstante, se trata de un estudio con un tamaño de muestra muy pequeño (13 mujeres sanas y 6 pacientes diabéticos) y otros posibles sesgos, como la edad media más joven de los controles sanos en comparación con la de los sujetos diabéticos o el hecho que todos los controles fuesen mujeres.

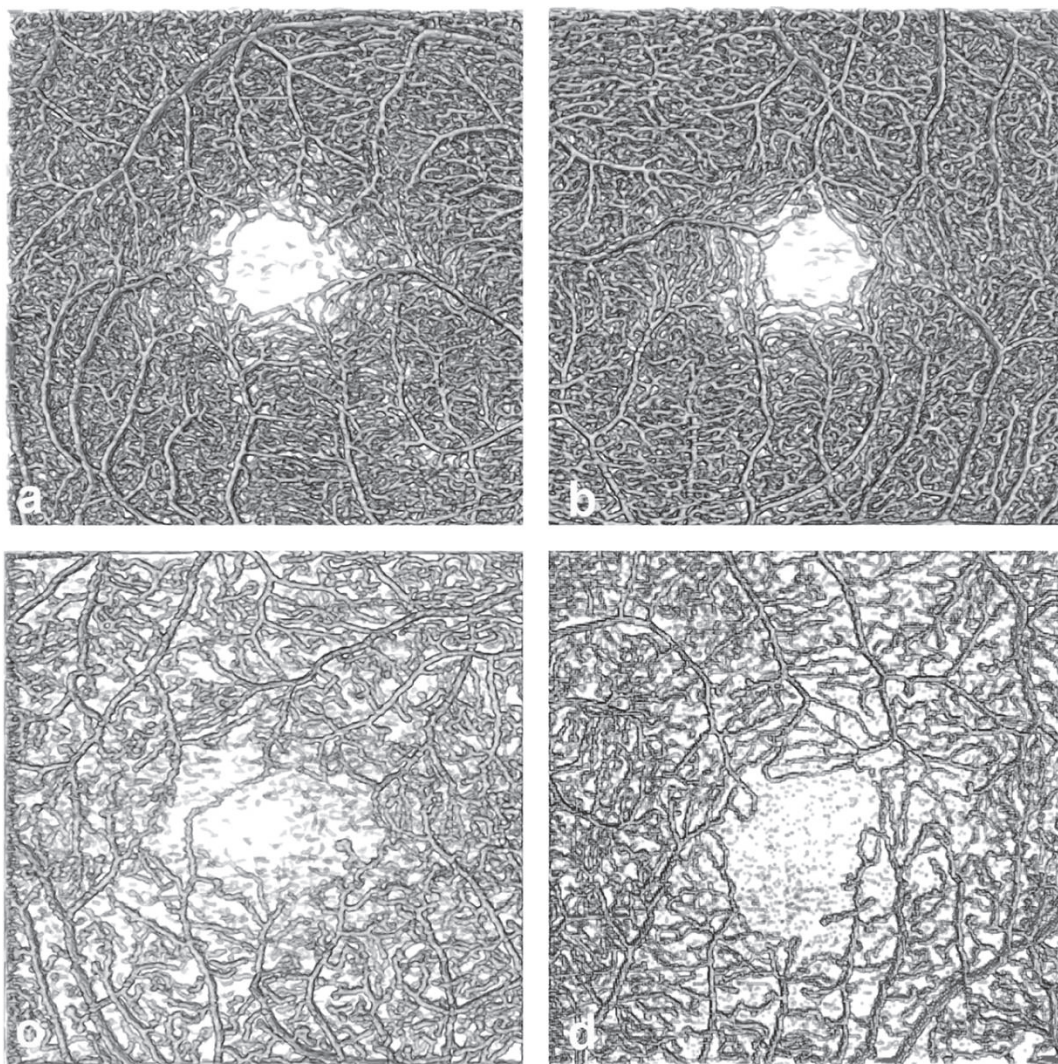


Figura 14. Comparación de reconstrucciones tridimensionales de OCTA en un estudio piloto en ojos sanos y ojos con retinopatía diabética. La retina normal (a, b) muestra una red muy densa de vasos con una zona avascular foveolar relativamente central y simétrica. En los ojos con retinopatía diabética (c, d), la densidad vascular se encuentra significativamente reducida, el calibre del vaso es más grueso e irregular y la zona avascular foveolar más ancha. Los vasos de los ojos diabéticos tienen una forma más redonda que los sanos. Los segmentos sin flujo son más comunes en ojos diabéticos. Imagen publicada en Maloca PM, Spaide RF, de Carvalho ER, Studer HP, W Hasler P, Scholl HPN, et al. Novel biomarker of sphericity and cylindricity indices in volume-rendering optical coherence tomography angiography in normal and diabetic eyes: a preliminary study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2020;258(4):711-23. (27)

Por estos motivos, eran precisos nuevos estudios con un mayor tamaño muestral para validar estos parámetros derivados de 3D-OCTA en sujetos sanos y dilucidar sus variaciones ante variables naturales como sexo, edad y diferentes parámetros oculares y, en un segundo tiempo, enfermedades. Esta línea de investigación es importante no solo para conocer mejor la anatomía vascular retiniana y sus interrelaciones, sino que

permitiría también en un futuro, a través del estudio de parámetros cuantitativos, establecer nuevos biomarcadores de enfermedades vasculares retinianas o incluso sistémicas.

Este trabajo tiene como objetivo validar un método para generar reconstrucciones tridimensionales de los vasos de la retina a partir de imágenes de OCTA y obtener medidas objetivas de dos nuevos parámetros de los vasos retinianos, volumen y superficie vascular, en una gran cohorte de controles sanos. La finalidad es establecer una base de datos normativa de estos parámetros en individuos sanos y evaluar las relaciones que puedan tener con variables oculares (equivalente esférico, longitud axial, mejor agudeza visual corregida) y sistémicas (edad, sexo), con el propósito de mejorar nuestro entendimiento sobre la fisiología vascular de la retina y así en estudios futuros poder investigar diferencias en estos parámetros entre controles sanos y procesos patológicos.

7. HIPÓTESIS

Es posible generar reconstrucciones tridimensionales de los vasos de la retina a partir de imágenes de angiografía por tomografía de coherencia óptica y obtener dos nuevos parámetros de los vasos retinianos en una gran cohorte de controles sanos: volumen y superficie vascular.

8. OBJETIVOS

Objetivo principal

Establecer una base de datos de normalidad de los parámetros superficie y volumen vascular de la retina a partir de imágenes de 3D-OCTA en individuos sanos.

Objetivos secundarios

1. Evaluar si existe una relación entre las variables principales (superficie y volumen vascular) y las variables secundarias oculares (equivalente esférico, longitud axial, agudeza visual mejor corregida)
2. Evaluar si existe una relación entre las variables principales (superficie y volumen vascular) y las variables secundarias sistémicas (edad, sexo).

9. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

9.1 ARTÍCULO 1

Maloca PM, Feu-Basilio S, Schottenhamml J, Valmaggia P, Scholl HPN, Rosinés-Fonoll J, Marin-Martinez S, Inglin N, Reich M, Lange C, Egan C, Zweifel S, Tufail A, Spaide RF, Zarranz-Ventura J.

Reference database of total retinal vessel surface area derived from volume-rendered optical coherence tomography angiography.

Sci Rep. 2022;12(1):3695.

Factor de impacto (2022): 4,6 Journal Citation Report (JCR)

Segundo cuartil (22/73, MULTIDISCIPLINARY SCIENCES), JCR 2022

DOI: [10.1038/s41598-022-07439-2](https://doi.org/10.1038/s41598-022-07439-2)

PMID: [35256644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35256644/)

RESUMEN

Introducción: La angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCTA) es una herramienta de alta resolución que permite una visualización detallada del flujo tridimensional y del tejido no vascular de la retina. De esta manera, permite la cuantificación tridimensional de parámetros como el área de superficie vascular retiniana. A pesar del uso extensivo de la OCTA, todavía no se han publicado datos de referencia del área de superficie vascular de la retina a partir de reconstrucciones tridimensionales de OCTA.

Objetivo: Desarrollar y publicar la primera base de datos del parámetro superficie vascular a partir de reconstrucciones tridimensionales de OCTA en sujetos sanos.

Métodos: En este estudio, se midieron las áreas de superficie de los vasos mediante reconstrucciones tridimensionales de OCTA (3D-OCTA) en 203 ojos de 107 participantes sanos. Se llevó a cabo un análisis mediante la creación de un modelo lineal generalizado (GLM) para investigar los efectos del sexo, la edad, el equivalente esférico, la longitud axial y la agudeza visual en el área de la superficie vascular.

Resultados: El área de superficie media total de los vasos retinianos fue de 54,53 mm² (rango de 27,03 a 88,7 mm²). Se encontró una ligera correlación negativa entre el área de superficie y la edad. Sin embargo, el análisis del modelo GLM identificó que la longitud axial tiene el efecto más fuerte sobre la superficie vascular. No se encontraron correlaciones significativas para el sexo ni entre los ojos izquierdo y derecho.

Conclusión: Este es el primer estudio que caracteriza el parámetro vascular tridimensional de la superficie vascular en una población basándose en OCTA.



OPEN

Reference database of total retinal vessel surface area derived from volume-rendered optical coherence tomography angiography

Peter M. Maloca^{1,2,11}✉, Silvia Feu-Basilio^{3,11}, Julia Schottenhamml⁴, Philippe Valmaggia¹, Hendrik P. N. Scholl^{1,2}, Josep Rosinés-Fonoll³, Sara Marin-Martinez³, Nadja Inglin¹, Michael Reich⁵, Clemens Lange⁵, Catherine Egan⁶, Sandrine Zweifel^{7,8}, Adnan Tufail⁶, Richard F. Spaide⁹ & Javier Zarranz-Ventura^{3,6,10}

Optical coherence tomography angiography (OCTA) enables three-dimensional, high-resolution, depth-resolved flow to be distinguished from non-vessel tissue signals in the retina. Thus, it enables the quantification of the 3D surface area of the retinal vessel signal. Despite the widespread use of OCTA, no representative spatially rendered reference vessel surface area data are published. In this study, the OCTA vessel surface areas in 203 eyes of 107 healthy participants were measured in the 3D domain. A Generalized Linear Model (GLM) model analysis was performed to investigate the effects of sex, age, spherical equivalent, axial length, and visual acuity on the OCTA vessel surface area. The mean overall vessel surface area was 54.53 mm² (range from 27.03 to 88.7 mm²). OCTA vessel surface area was slightly negatively correlated with age. However, the GLM model analysis identified axial length as having the strongest effect on OCTA vessel surface area. No significant correlations were found for sex or between left and right eyes. This is the first study to characterize three-dimensional vascular parameters in a population based on OCTA with respect to the vessel surface area.

For decades, fluorescein angiography (FA) has been the gold standard for retinal vessel imaging¹ despite the fact that it is an invasive^{2,3} and time-consuming procedure that causes mild to severe adverse reactions. In addition, fluorescein angiography does not show the radial peripapillary capillary network, the intermediate capillary plexus or the deep capillary plexus⁴. Thus, the fact of the matter is FA does not adequately image retinal blood flow.

In this context, optical coherence tomography angiography (OCTA) has been successfully introduced as a depth resolved imaging technique that displays the movement of blood within the vessels with the help of intrinsic signals^{4–6} and without the need for a dye injection⁷. Consequently, OCTA has evolved into a fast, safe, and frequently used ophthalmic imaging technology⁸ that demonstrates great promise in terms of improving our understanding of the physiology and pathophysiology of the eye⁶.

For example, in diabetic retinopathy, OCTA provided capillary perfusion density maps for the quantification of the deep capillary layers, which aided in documenting disease progression and in assessing risk stratification^{9–11}. Furthermore, OCT and OCTA were applied in the diagnosis, monitoring, and indications for

¹Institute of Molecular and Clinical Ophthalmology Basel, 4031 Basel, Switzerland. ²Department of Ophthalmology, University Hospital Basel, 4031 Basel, Switzerland. ³Institut Clínic d'Oftalmologia, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain. ⁴Pattern Recognition Lab, University Erlangen-Nürnberg, 91058 Erlangen, Germany. ⁵Eye Center, Medical Center - University of Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany. ⁶Moorfields Eye Hospital NHS Foundation Trust, London EC1V 2PD, UK. ⁷University Hospital Zurich, Frauenklinikstrasse 24, 8091 Zurich, Switzerland. ⁸University of Zurich, Rämistrasse 71, 8006 Zürich, Switzerland. ⁹Vitreous-Retina-Macula Consultants of New York, New York, NY, USA. ¹⁰Institut de Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain. ¹¹These authors contributed equally: Peter M. Maloca and Silvia Feu-Basilio. ✉email: peter.maloca@iob.ch

	Age	SE	AL	VA	Surface overall	Surface male left	Surface female left	Surface male right	Surface female right
Count	203	197	200	202	203	39	63	36	65
Mean	43.39	− 0.41	23.8	0.97	54.53	54.52	54.75	55	54.07
S.d.	14.05	2.04	1.03	0.07	10.8	7.2	11.66	10.79	11.89
Min	19.37	− 5.75	21.59	0.6	27.03	39.74	33.98	32.59	27.03
25%	31.08	− 1.38	23.07	0.95	47.25	50.14	45.76	49.54	45.26
50%	41.25	− 0.25	23.68	1	54.56	54.13	54.56	53.88	56.72
75%	56.84	0.5	24.49	1	61.6	57.83	62.2	63.56	61.21
Max	73.49	5.59	26.92	1	88.7	70.48	88.7	74.27	85.83

Table 1. Summary statistics of age, spherical equivalent (SE), axial length (AL), visual acuity (VA), and optical coherence tomography angiography (OCTA) retinal vessel surface area measurements. Summary statistics are calculated from 203 eyes (102 left and 101 right). Count indicates the number of eyes for which the respective measurements were available. Mean, s.d., min, 25%, 50%, 75%, and max indicate mean, standard deviation, minimum, 1st quartile, 2nd quartile, 3rd quartile, and maximum, respectively. Surface measurements are in mm².

therapeutic interventions in age-related macular degeneration^{12,13}, which might affect more than 20% of the aging population¹⁴. In addition to magnetic resonance imaging, OCT and OCTA have emerged as beneficial imaging tools in multiple sclerosis¹⁵. The retinal vessel volume-rendering showed the altered microcirculation in the macula, for example in fovea plana, which is important because these eyes cannot fit into the scheme of normative data banks offered by the commercial manufacturers¹⁶.

Although the information obtained from OCTA is three dimensional, a compromise between the amount of information and the display capabilities^{17–20} was made by condensing the extracted information to a one-pixel thick planar view of selected layers which is currently used as the standard display method^{21,22}. Although this trade-off seems reasonable, blood vessels are three dimensional structures designed to carry blood and facilitate exchange so that their three dimensional course²³ is incompletely captured by the ordinary planar en face views.

As a further limitation to this simplified visualization of OCTA data, it can be stated that previous OCTA investigations are based in part of a relatively small number of subjects^{19,24} and that controversial values for age^{19,25,26} and sex^{19,27} and correlations for axial length (AL)^{28,29} were reported.

A more appropriate way to evaluate OCTA features is in three dimensions to assess the physical characteristics of the vessels including such as the retinal vessel surface area which is particularly important for the metabolic exchange in the retina.

Therefore, utilizing the representation of three-dimensional OCTA data allows us in this study to expand the scope of the current 2D OCTA image display method by means of describing a fully automatic technology for the 3D rendering of OCTA in healthy eyes, providing a 3D rendered normative raw database of the naturally occurring variations in the retinal vascular surface area in healthy individuals, and determining the association of sex, age, spherical equivalent (SE), AL, and visual acuity (VA) with OCTA retinal vascular surface area.

Results

Summary statistics and data plots. The OCTA measurements from 203 eyes (102 left, 101 right) of 107 subjects (61.7% female) were included. Five out of 203 eyes were pseudophakic, and 97.5% of the eyes were phakic. Twenty-three eyes were excluded because of the presence of coronary heart disease (n = 2), peripheral vascular disease (n = 10), high myopia (n = 2), amblyopia (n = 6), or cataract (n = 1).

Overall mean OCTA vessel surface was 54.53 mm² (range from 27.03 to 88.70 mm²). To avoid correlation effects between the eyes, further results are splitted by right and left eyes. Mean surface areas in males were 55.00 mm² (range from 32.59 to 74.27 mm²), and 54.52 mm² (range from 39.74 to 70.48 mm²), for the right and left eye, respectively. Mean surface areas in females were 54.07 mm² (range 27.03 to 85.83 mm²) and 54.75 mm² (range from 33.98 to 88.70 mm²) for right and left eyes, respectively. For the participants, the width of range from minimum to maximum varies up to 56% for males and up to 38% for females. The summary statistics are presented in Table 1, and the data are plotted in Fig. 1. All the measured raw data are summarized in Supplementary raw data S1 (right eyes) and Supplementary adjusted raw data S2 (left eyes). Also included are the proposed corrections for Ocular Magnification Effects (OME).

Similar but not significant results were found in both sexes and are summarized in Fig. 1 and Table 1. In the left eye, the standard deviation was higher in females than in males.

Correlation analysis. Pearson correlation coefficients between OCTA retinal vessel surface area and age were − 0.11 and − 0.21 for right and left eyes, respectively. Testing for non-correlation revealed no significant correlation in right eyes (*p*-value: 0.282) but a significant negative correlation in left eyes (*p*-value: 0.033). Pearson correlation coefficients between OCTA retinal vessel surface area and AL were − 0.20 and − 0.26 with *p*-values 0.049 and 0.009 in right and left eyes, respectively.

Generalized linear model (GLM) analysis. A GLM analysis was performed to investigate the effects of independent variables, such as age, sex, SE, AL, and VA, on OCTA vessel surface area. The analysis (Table 2)

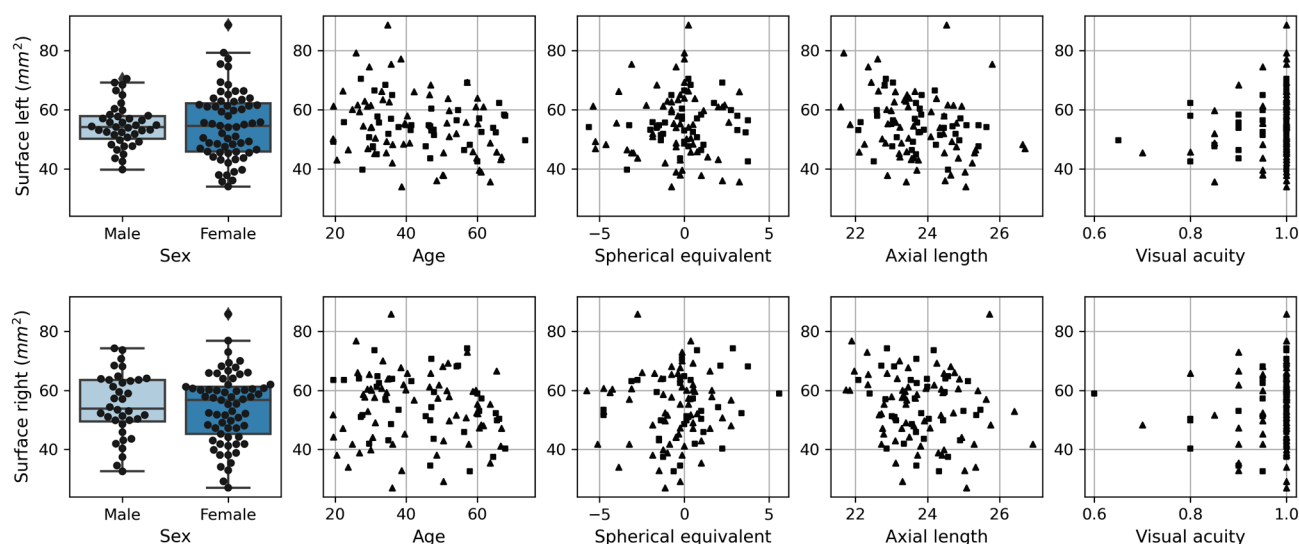


Figure 1. Univariate box plots and scatter plots. Plots in the first row are based on data from the left eyes (OS). Plots in the second row are based on data from the right eyes (OD). Boxplots are grouped by sex. Scatter plots are drawn for age, spherical equivalent, axial length, and visual acuity. Males (females) are indicated by squares (triangles) in the scatter plots. Optical coherence tomography angiography retinal vessel surface area measurements are in mm^2 .

Effect	Right eyes			Left eyes		
	F value	Pr (> F)	Sign	F value	Pr (> F)	Sign
Age	0.5449	0.46256		2.2139	0.14075	
Sex	0.3855	0.5364		2.7446	0.10155	
SE	0.0007	0.97953		2.6764	0.10583	
AL	3.979	0.04944	*	23.6357	5.81E-06	***
VA	0.6933	0.40748		3.9005	0.05177	
Age:sex	2.3644	0.12803		2.0895	0.15227	
Age:SE	0.2595	0.61184		0.3691	0.54522	
Age:AL	0.3242	0.57067		0.1925	0.66204	
Age:VA	0.3794	0.53968		0.1254	0.72424	
Sex:SE	4.3716	0.03968	*	1.6124	0.20788	
Sex:AL	1.3961	0.24084		2.4731	0.1198	
Sex:VA	0.3656	0.5471		0.0375	0.84688	
SE:AL	0.5191	0.47328		0.0001	0.9924	
SE:VA	0.2368	0.62783		0.0222	0.88192	
AL:VA	0.9001	0.34558		0.315	0.57619	

Table 2. Generalized linear model (GLM) analysis results. A GLM analysis was performed for the left and right eyes separately. The main effects of the independent variables, age, sex, spherical equivalent (SE), axial length (AL), and visual acuity (VA), and all the possible two-way interactions were taken into consideration. p-values were calculated using the *F*-test statistic. The “Sign” columns indicate significance codes: 0, ‘***’, 0.001, ‘**’, 0.01, ‘*’, 0.05 ‘.’, and 0.1, ‘.’ 1.

showed that, in the left and right eyes, the main effect of AL had a significant effect on the vessel surface. Regarding AL, the effect was clearer in the left eye ($p < 0.001$) than in the right eye ($p = 4.9 \times 10^{-2}$). In the right eye, a two-way interaction, sex:SE, was found to have a significant effect at a significance level of 0.05. Other main effects and two-way interactions were not significant in either eye at a significance level of 0.05.

Right vs. left eyes. A paired two-sided *t*-test on the OCTA vessel surface area performed to compare the left and right eyes yielded a p-value of 0.76 (value of *t*-test statistic, 0.306). There was no significant difference in the OCTA retinal surface area between the left and right eyes.

Age, SE, and VA. In the age group analysis, no impact on vessel surface area was found. Similarly, no significant effects of SE or VA were observed.

Discussion

Optical coherence tomography angiography has been rapidly adapted into clinical practice³⁰ in a vast number of eye diseases, such as diabetic retinopathy^{6,31–33} and age-related macular degeneration^{34,35}; further, it was also implemented for imaging in neurodegenerative diseases³⁶. So far, in most of these studies, a common 2D depiction of OCTA data has been used as a so-called en face representation^{5,30} which served as a trade-off between the amount of data and the capabilities of data representation.

As retinal vessels do not grow in two dimensions, the ordinary 2D OCTA display method is evidently only able to show limited areas of the retinal vasculature. Therefore, the scope of this study was to extend the current OCTA method with a novel approach into the 3D realm and to measure the naturally occurring variations of retinal vessel surface areas in healthy subjects^{37–39}. This is of particular interest because the vascular surface in the retina represents the most important diffusion barrier and participates in the exchange of small molecules such as oxygen and glucose from the blood to the surrounding tissue. Thus, volume-rendered vessel surface data can be useful for example in diabetic retinopathy in which a decrease of pericytes is associated with a loss of the capillary network and therefore inevitably also from the vessel surface contributing to the end-stage and blindness⁴⁰.

Furthermore, although normative en face OCTA data have been reported^{18,19}, this is the first reference report on volume-rendered OCTA vessel surface area values to date: the mean overall vessel surface area was 54.43 mm² for a retinal optical specimen measuring approximately 2.25 mm³. For the participants, the width of range from minimum to maximum varies up to 56% for males and up to 38% for females. This rather wide bandwidth is remarkably large, so it will be important for future studies to include a sufficiently large number of eyes if retinal vessels are to be compared.

One of the main findings of this study was that the vessel surface area was strongly correlated with the axial length of the eye ($p = 0.049$ for the right eye, $p = 0.009$ for the left eye). This result is in agreement with those of other reports^{24,41,42} using en face OCTA data.

The influence of sex and age on retinal OCTA perfusion has been a controversial topic as some studies have described a correlation, while others have failed to demonstrate an influence^{19,27,43}. Possible reasons for this are the relatively small number of subjects in previous studies, different segmentation levels, and the simultaneous examination of both eyes; consequently, the scope for identifying correlations between the eyes could have been limited. However, in this study, the influence of common segmentation errors was avoided because the vessel volumes were rendered. This study has found a slight negative correlation between age and vessel surface area in right and left eyes. The negative correlation was significant in left eyes but not so in right eyes as revealed by tests for non-correlation (significance level 0.05). In order to investigate the joint influence of sex, age, SE, AL, and VA on the OCTA vessel surface area a GLM analysis was performed. Interestingly, the GLM analysis found a strong influence of AL in both eyes but it didn't detect a significant influence of age on vessel surface area in neither left nor right eyes (significance level 0.05). This finding highlights the importance of considering more variables than just age and sex when studying OCTA perfusion. In this study, the slight negative correlation between age and vessel surface area turned out to be non-significant when including more explanatory variables in the model.

This study has a few limitations that should be noted. A key shortcoming of OCTA is that the image of blood flow does not correspond to the actual blood vessel lumen but a convolution of the flow as influenced by the OCT device and software used for flow detection^{6,44}. Thus, OCTA signal saturates at a very low flow level and the imaged vessel diameter may be somewhat larger than the actual vessel diameter. This will make it difficult to interpret findings across different devices because every device uses different algorithms. Another limitation was that the OCTA data were exported as raw files and therefore projection artifact removal^{44,45} was not provided by the manufacturer's software. Therefore, the measured values have to be considered with care. Nevertheless, the patient group was a fairly representative group with a healthy retina and no potential pathological inclusions that could trigger additional artifacts.

One issue in determining the true size of an object from OCTA measurements is the ocular magnification effect which states that the true size of an object in OCTA depends on the magnification factor of the eye⁴⁶. This magnification factor is generally unknown even though there are methods to estimate it from axial eye length^{47,48}. Regarding this study, it was decided not to apply any correction to the raw OCTA data since there are no published international standards. However, in Supplementary raw data S1 and S2 we provide, along with the OCTA retinal vessel surface area based on raw OCTA data, a possible type of correction of the surface area based on Littmann's method⁴⁷ and Bennett's formula⁴⁸. If there were standards for the correction of the ocular magnification effect, the correction of the values could be carried out quite easily. Nevertheless, the discussion remains yet unresolved whether these formulas are also applicable to a 3D environment. The advantage of the current data is that they are raw data without any modifications, which makes their further application more generalizable. The measured values are arguably valuable, but will only be of benefit when applied to retinal pathologies, which will be addressed in future studies. As already known with regard to conventional 2D en face OCTA, the data quality and OCTA artefacts⁴¹ will probably also influence the values obtained with volume rendering. This was counteracted by only including measurements with sufficient signal quality and a relatively high number of subjects.

A limit could be that currently no reproducibility test has been performed. Nevertheless, for the reproducibility of the described OCTA method, a mean intraclass correlation coefficient (ICC) of 0.845 or a mean ICC of 0.999, and an intraclass coefficient of variation of 0.07 or 0.0006, was reported earlier³⁹ so that it is comparable to standard en face OCTA methods^{49,50}.

Moreover, a limitation could be that no visual field measurements were recorded. Such a laborious procedure is unusual in routine clinical examinations where the data were collected for this study.

In summary, this study showed that it is possible to measure the vessel surface area using an expanded volume-rendered OCTA realm. This is important because the vessel surface area is the essential diffusion barrier

for the exchange of metabolites and oxygen in the retina. It must be considered that the vessel surface area can be influenced by the AL of the eye and by a remarkably wide bandwidth within the healthy individuals.

Methods

Subjects. The study was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. All the participants were seen at the Institut Clínic d'Oftalmologia, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain. OCTA images and relevant ocular and systemic clinical data were recorded prospectively during a 24-month period, as part of a larger prospective OCTA trial (ClinicalTrials.gov, trial number NCT03422965). All data were captured between 4 and 6 pm. This project was approved by the Institutional Review Board of the Hospital Clínic of Barcelona (HCB/2016/0216), and written informed consent was obtained from each subject. Each participant underwent a comprehensive ophthalmological examination, as described elsewhere^{51,52}. The relevant ocular clinical data that were collected included best-corrected visual acuity (BCVA), SE, slit-lamp biomicroscopy results, intraocular pressure measurements, retinal fundus examination results, and AL (IOL Master, Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA). The collected systemic clinical data included age, sex, smoking status, systolic and diastolic blood pressure, height, weight, and body mass index (BMI). A comprehensive battery of OCT and OCTA images was captured using a Cirrus 5000 OCT device (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA). The current device has only a limited function for the removal of projection artifacts which is only possible in the overlays "Deep", "Avascular", "Choriocapillaris", "Choroid" and does not allow this modality for the export of raw data.

The inclusion criteria were as follows: Caucasian origin, age ≥ 18 years, no history of any eye disease or neurodegenerative disease, the ability to fixate steadily, and clear optical media in the examined eye.

The exclusion criteria were refusal to provide written informed consent; the presence of diabetes, coronary heart diseases, or peripheral vascular diseases; amblyopia; high myopia above minus 6 diopters; and the presence of epiretinal gliosis or media opacities, including cataract.

OCTA imaging procedure. A single OCTA volume scan of the central macula was performed per eye using a Spectral-Domain Cirrus® HD-OCT system (Carl Zeiss Meditec, Dublin, USA). This resulted in a one-volume OCTA scan, with dimensions of $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 2\text{ mm}$, comprising $245 \times 245 \times 1024$ pixels. Only scans with at least seven out of 10 OCT signal intensities, as displayed on the device, were selected.

Image processing and total vessel surface area. OCTA data were exported from the OCT device as proprietary raw data in the .img image format using the software provided by the device manufacturer. Using the Zeiss raw data did not allow for the use of the direct artifact removal feature provided as part of the device manufacturer's software. The images were automatically converted to one en face .bmp sequence per eye, resulting in an optical specimen of $3 \times 3 \times 2\text{ mm}$ per eye (Fig. 2). Image post-processing included the application of an automatic script written in MATLAB R2017a (MathWorks Inc., Natick, USA), through which the retinal flow signal was separated and made suitable for the measurement of the total 3D vessel surface area; details regarding this method, including its reproducibility, were previously reported on⁵³. Briefly summarized:

The first step was to increase the contrast with the contrast limited adaptive histogram equalization (CLAHE). Afterwards, the images were processed with image sharpening using unsharp masking using built-in Matlab functions. The representation of the vessel signals was enhanced by using "vesselness" filters in order to be able to calculate the "vesselness" per pixel afterwards. The final step involved the application of a hysteresis threshold so that binary maps of the vessels were created from the preprocessed data. Finally, MATLAB provided the possibility to measure the entire vessel surface based on the voxel values.

The individual MATLAB parameters were as follows: CLAHE enhancement limit 1, number of bins 5, alpha distribution 0, vesselness filter minimum scale 10, maximum scale 15, lower threshold 40, upper threshold 45, and minimum size 30.

Summary statistics and data plots. The following summary statistics were calculated across all eyes for the independent variables, age, SE, AL, VA, and OCTA retinal vessel surface area: mean, standard deviation, minimum, 1st quartile, 2nd quartile, 3rd quartile, and maximum values. In addition, summary statistics were calculated separately for male right eyes, female right eyes, male left eyes, and female left eyes. For visualization, univariate box plots and scatter plots were generated by plotting one independent variable at a time versus the OCTA retinal vessel surface area. Plots were generated separately for the left and right eyes. Summary statistics were calculated in Python v3.8⁵⁴ with pandas v1.1⁵⁵ and boxplots were generated in Python with Matplotlib v3.3⁵⁶.

Correlation analysis. Pearson correlation coefficients were calculated (1) between OCTA retinal vessel surface area and age and (2) between OCTA vessel surface area and AL. Furthermore, tests for non-correlation were performed based on the Pearson correlation coefficients. Right and left eyes were investigated separately. Calculations were done in Python v3.8 with scipy v1.6⁵⁷.

GLM analysis. A GLM analysis was performed on the left and right eyes separately in order to investigate the main effects of the independent variables, sex, age, SL, AL, and VA, and all the possible two-way interactions with the dependent variable, OCTA retinal vessel surface area. Sex was treated as a discrete variable, and age, SL, AL, and VA, as continuous variables. Before the analysis, two outliers were removed in the case of the left eye. The GLM analysis was performed in R v3.6⁵⁸ with car v3.0⁵⁹ using the type II sum of squares estimation method. The interaction terms that were found with the type II sum of squares analysis were also found with the type

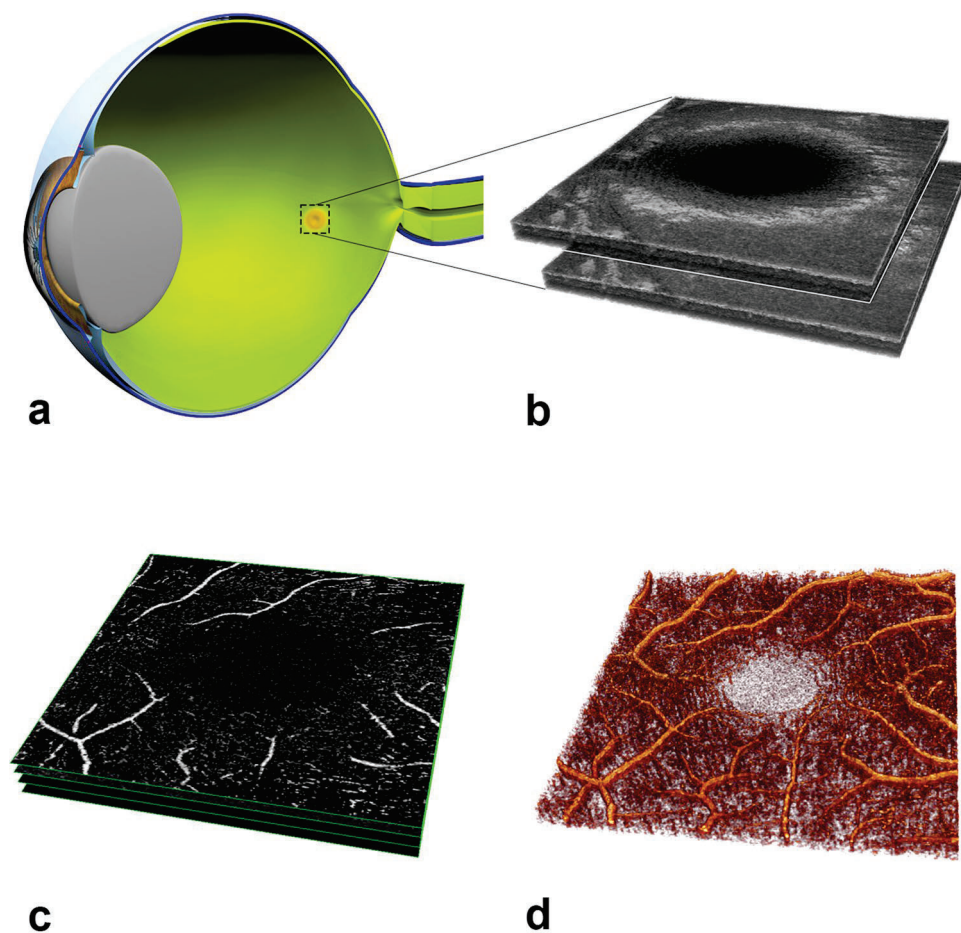


Figure 2. Presentation of image processing in three-dimensional optical coherence tomography angiography. (a) Schematic representation of an eye that has been cut open in order to provide a better explanation. In the posterior region, a brownish area is depicted, which corresponds to the location of the sharpest vision, the macula. Cross-sectional images of the macula in the area of the rectangle were captured from the same location. (b) These images correspond to structural OCT data that can be rendered into a volume representation. By repeatedly applying the same volume (here, two such volumes are shown as an example), the change in the OCT signal compared to the static tissue signal, which does not change much, can be interpreted as representing the blood flow. (c) Based on this, a common representation of the blood flow within the vessels can be shown via an en face image display method. Four such cross-sectional en face images are depicted here (each highlighted in green). However, as a trade-off between the amount of data and the processing, the intervening vessel parts are lost. (d) A three-dimensional rendering of the same data, showing the entire course of the vessels and their interrelationship. The rounded and vascular-free area in the center corresponds to the foveolar avascular zone (FAZ), in which the photoreceptors can interact as directly as possible with light.

III sum of squares analysis (with the same significance codes), which is more reliable for identifying interaction effects (type III sum of squares results are not shown). GLM analyses were performed to identify the link function and Gaussian noise.

Right vs. left eyes. A two-sided paired *t*-test was performed to investigate whether the left and right eyes differed in terms of the OCTA retinal vessel surface area. For this purpose, data from 94 subjects, whose left and right eye data were recorded, were used. The *t*-test was performed in Python v3.8 with scipy v1.6⁵⁷.

Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study are available in Supplementary raw data S1 for the right eye and Supplementary raw data S2 for the left eye.

Received: 26 July 2021; Accepted: 18 February 2022

Published online: 07 March 2022

References

- Merin, L. M. Fluorescein angiography printouts. *Ann. Ophthalmol.* **12**, 441–443 (1980).

2. Leila, L. Adverse effects of fluorescein angiography. *Acta Ophthalmol. Scand.* **84**, 720–721. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0420.2006.00776.x> (2006).
3. Kornblau, I. S. & El-Annan, J. F. Adverse reactions to fluorescein angiography: A comprehensive review of the literature. *Surv. Ophthalmol.* **64**, 679–693. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2019.02.004> (2019).
4. Spaide, R. F., Klancnik, J. M. Jr. & Cooney, M. J. Retinal vascular layers imaged by fluorescein angiography and optical coherence tomography angiography. *JAMA Ophthalmol.* **133**, 45–50. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.3616> (2015).
5. Spaide, R. F., Fujimoto, J. G. & Waheed, N. K. Optical coherence tomography angiography. *Retina* **35**, 2161–2162. <https://doi.org/10.1097/iae.0000000000000881> (2015).
6. Spaide, R. F., Fujimoto, J. G., Waheed, N. K., Sadda, S. R. & Staurengli, G. Optical coherence tomography angiography. *Prog. Retin. Eye Res.* **64**, 1–55. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.11.003> (2018).
7. Le Rouic, J. F. *et al.* Indications for fluorescein angiography and optical coherence tomography angiography (OCTA) in medical retina: Changes from 2015 and 2018. *J. Fr. Ophthalmol.* **43**, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2019.09.013> (2020).
8. Savastano, M. C. *et al.* Fluorescein angiography versus optical coherence tomography angiography: FA vs OCTA Italian Study. *Eur. J. Ophthalmol.* <https://doi.org/10.1177/1120672120909769> (2020).
9. Hwang, T. S. *et al.* Optical coherence tomography angiography features of diabetic retinopathy. *Retina* **35**, 2371–2376. <https://doi.org/10.1097/iae.0000000000000716> (2015).
10. Ting, D. S., Cheung, G. C. & Wong, T. Y. Diabetic retinopathy: Global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: A review. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **44**, 260–277. <https://doi.org/10.1111/ceo.12696> (2016).
11. Yau, J. W. *et al.* Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* **35**, 556–564. <https://doi.org/10.2337/dc11-1909> (2012).
12. Sadda, S. R. *et al.* Consensus definition for atrophy associated with age-related macular degeneration on OCT: Classification of atrophy report 3. *Ophthalmology* **125**, 537–548. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.09.028> (2018).
13. Spaide, R. F. *et al.* Consensus nomenclature for reporting neovascular age-related macular degeneration data: Consensus on neovascular age-related macular degeneration nomenclature study group. *Ophthalmology* **127**, 616–636. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.11.004> (2020).
14. Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G. & Wong, T. Y. Age-related macular degeneration. *Lancet* **379**, 1728–1738. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)60282-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)60282-7) (2012).
15. Britze, J. & Frederiksen, J. L. Optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Eye* **32**, 884–888. <https://doi.org/10.1038/s41433-017-0010-2> (2018).
16. Fragiotta, S. *et al.* Volume rendering of angiographic optical coherence tomography angiography in fovea plana and normal foveal pit. *Front. Neurol.* **12**, 633492. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.633492> (2021).
17. Yilmaz, H. *et al.* Normative data assessment of vessel density and foveal avascular zone metrics using angioscan software. *Curr. Eye Res.* **44**, 1345–1352. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1639769> (2019).
18. Banc, A. & Ungureanu, M. I. Normative data for optical coherence tomography in children: A systematic review. *Eye* **35**, 714–738. <https://doi.org/10.1038/s41433-020-01177-3> (2021).
19. Coscas, F. *et al.* Normative data for vascular density in superficial and deep capillary plexuses of healthy adults assessed by optical coherence tomography angiography. *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* **57**, 211–223. <https://doi.org/10.1167/iov.15-18793> (2016).
20. Fernández-Vigo, J. I. *et al.* Normative database of peripapillary vessel density measured by optical coherence tomography angiography and correlation study. *Curr. Eye Res.* **45**, 1430–1437. <https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1744164> (2020).
21. Koustenis, A. Jr. *et al.* Optical coherence tomography angiography: An overview of the technology and an assessment of applications for clinical research. *Br. J. Ophthalmol.* **101**, 16–20. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309389> (2017).
22. Tan, A. C. S. *et al.* An overview of the clinical applications of optical coherence tomography angiography. *Eye* **32**, 262–286. <https://doi.org/10.1038/eye.2017.181> (2018).
23. Maloca, P. M. *et al.* Enhanced resolution and speckle-free three-dimensional printing of macular optical coherence tomography angiography. *Acta Ophthalmol.* **97**, e317–e319. <https://doi.org/10.1111/aos.13567> (2019).
24. Wen, C., Pei, C., Xu, X. & Lei, J. Influence of axial length on parafoveal and peripapillary metrics from swept source optical coherence tomography angiography. *Curr. Eye Res.* **44**, 980–986. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1607393> (2019).
25. Gadde, S. G. *et al.* Quantification of vessel density in retinal optical coherence tomography angiography images using local fractal dimension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 246–252. <https://doi.org/10.1167/iov.15-18287> (2016).
26. Rao, H. L. *et al.* Determinants of peripapillary and macular vessel densities measured by optical coherence tomography angiography in normal eyes. *J. Glaucoma* **26**, 491–497. <https://doi.org/10.1097/ijg.0000000000000655> (2017).
27. Alnawaiseh, M., Brand, C., Lauermann, J. L. & Eter, N. Flow density measurements using optical coherence tomography angiography: Impact of age and gender. *Der Ophthalmol.* **115**, 659–662. <https://doi.org/10.1007/s00347-017-0539-2> (2018).
28. Al-Sheikh, M. *et al.* Quantitative OCT angiography of the retinal microvasculature and the choriocapillaris in myopic eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 2063–2069. <https://doi.org/10.1167/iov.16-21289> (2017).
29. Suwan, Y. *et al.* Association of myopia with peripapillary perfused capillary density in patients with glaucoma: An optical coherence tomography angiography study. *JAMA Ophthalmol.* **136**, 507–513. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2018.0776> (2018).
30. Kashani, A. H. *et al.* Optical coherence tomography angiography: A comprehensive review of current methods and clinical applications. *Prog. Retin. Eye Res.* **60**, 66–100. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.07.002> (2017).
31. Lee, J. & Rosen, R. Optical coherence tomography angiography in diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **16**, 123. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0811-x> (2016).
32. Sarabi, M. S. *et al.* 3D retinal vessel density mapping with OCT-angiography. *IEEE J. Biomed. Health Inform.* **24**, 3466–3479. <https://doi.org/10.1109/jbhi.2020.3023308> (2020).
33. Borrelli, E., Sacconi, R., Brambati, M., Bandello, F. & Querques, G. In vivo rotational three-dimensional OCTA analysis of microaneurysms in the human diabetic retina. *Sci. Rep.* **9**, 16789. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53357-1> (2019).
34. Lupidi, M. *et al.* Optical coherence tomography angiography in age-related macular degeneration: The game changer. *Eur. J. Ophthalmol.* **28**, 349–357. <https://doi.org/10.1177/1120672118766807> (2018).
35. Schneider, E. W. & Fowler, S. C. Optical coherence tomography angiography in the management of age-related macular degeneration. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **29**, 217–225. <https://doi.org/10.1097/ico.0000000000000469> (2018).
36. Tsokolas, G., Tsaousis, K. T., Diakonis, V. F., Matsou, A. & Tyradellis, S. Optical coherence tomography angiography in neurodegenerative diseases: A review. *Eye Brain* **12**, 73–87. <https://doi.org/10.2147/eb.S193026> (2020).
37. Spaide, R. F., Yannuzzi, L. A. & Maloca, P. M. Retinal-choroidal anastomosis in macular telangiectasia type 2. *Retina* **38**, 1920–1929. <https://doi.org/10.1097/iae.0000000000002289> (2018).
38. Reich, M. *et al.* Negative vessel remodeling in stargardt disease quantified with volume-rendered optical coherence tomography angiography. *Retina* <https://doi.org/10.1097/iae.0000000000003110> (2021).
39. Maloca, P. M. *et al.* Novel biomarker of sphericity and cylindricity indices in volume-rendering optical coherence tomography angiography in normal and diabetic eyes: A preliminary study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **258**, 711–723. <https://doi.org/10.1007/s00417-019-04582-x> (2020).
40. Rask-Madsen, C. & King, G. L. Vascular complications of diabetes: Mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* **17**, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.012> (2013).

41. Ucak, T. *et al.* Alterations in optical coherence tomography angiography findings in patients with high myopia. *Eye* **34**, 1129–1135. <https://doi.org/10.1038/s41433-020-0824-1> (2020).
42. Devarajan, K. *et al.* Optical coherence tomography angiography for the assessment of choroidal vasculature in high myopia. *Br. J. Ophthalmol.* **104**, 917–923. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2019-314769> (2020).
43. Falavarjani, K. G. *et al.* Foveal avascular zone and vessel density in healthy subjects: An optical coherence tomography angiography study. *J. Ophthalmic Vis. Res.* **13**, 260–265. https://doi.org/10.4103/jovr.jovr_173_17 (2018).
44. Spaide, R. F., Fujimoto, J. G. & Waheed, N. K. Image artifacts in optical coherence tomography angiography. *Retina* **35**, 2163–2180. <https://doi.org/10.1097/iae.0000000000000765> (2015).
45. Ledesma-Gil, G., Fernandez-Avellaneda, P. & Spaide, R. F. Swept-source optical coherence tomography angiography image compensation of the choriocapillaris induces artifacts. *Retina* **40**, 1865–1872. <https://doi.org/10.1097/iae.0000000000002866> (2020).
46. Garway-Heath, D. F. *et al.* Measurement of optic disc size: Equivalence of methods to correct for ocular magnification. *Br. J. Ophthalmol.* **82**, 643–649. <https://doi.org/10.1136/bjo.82.6.643> (1998).
47. Littmann, H. Determination of the real size of an object on the fundus of the living eye. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **180**, 286–289. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1055068> (1982).
48. Bennett, A. G., Rudnicka, A. R. & Edgar, D. F. Improvements on Littmann's method of determining the size of retinal features by fundus photography. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **232**, 361–367. <https://doi.org/10.1007/bf00175988> (1994).
49. Lei, J. *et al.* Repeatability and reproducibility of superficial macular retinal vessel density measurements using optical coherence tomography angiography en face images. *JAMA Ophthalmol.* **135**, 1092–1098. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2017.3431> (2017).
50. Lee, J. C. *et al.* Intrasession repeatability and intersession reproducibility of peripapillary OCTA vessel parameters in non-glaucomatous and glaucomatous eyes. *Br. J. Ophthalmol.* **105**, 1534–1541. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-317181> (2021).
51. Zarranz-Ventura, J. *et al.* Evaluation of microvascular changes in the perifoveal vascular network using optical coherence tomography angiography (OCTA) in type I diabetes mellitus: A large scale prospective trial. *BMC Med. Imaging* **19**, 91. <https://doi.org/10.1186/s12880-019-0391-8> (2019).
52. Barraso, M. *et al.* Optical coherence tomography angiography in type 1 diabetes mellitus. Report 1: Diabetic retinopathy. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **9**, 34. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.10.34> (2020).
53. Maloca, P. Novel biomarker of sphericity and cylindricity indices in volume-rendering optical coherence tomography angiography in normal and diabetic eyes: A pilot study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **258**(4), 711–723 (2019).
54. Rossum, G. V. & Drake, F. L. *Python 3 Reference Manual* (CreateSpace, 2009).
55. McKinney, W. *et al.* Data structures for statistical computing in python. In *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*. **445**, 51–55 (2010).
56. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput. Sci. Eng.* **9**, 90. <https://doi.org/10.1109/mcse.2007.55> (2007).
57. Virtanen, P. *et al.* SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods* **17**, 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2> (2020).
58. Team, R. C. R: *A Language and Environment for Statistical Computing*. (2014).
59. Hayden, R. W. A review of: “An R companion to applied regression, second edition, by J. Fox and S. Weisberg”. *J. Biopharm. Stat.* **22**, 418–419. <https://doi.org/10.1080/10543406.2012.635980> (2012).

Acknowledgements

We thank Jolanda Burri for her data curation.

Author contributions

A.T.: Data curation, writing—review and editing, visualization. H.P.N.S.: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing, original draft preparation, writing—review and editing, visualization, project administration. J.Z.V.: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing, original draft preparation, writing—review and editing, visualization, project administration. M.R.: Data curation, writing—review and editing, visualization. C.L.: Data curation, writing—review and editing, visualization. C.E.: Data curation, writing—review and editing, visualization. N.I.: Data curation, writing—review and editing, visualization. P.M.M.: Conceptualization, methodology, software, validation, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing, original draft preparation, writing—review and editing, visualization, project administration. S.F.B.: Formal analysis, investigation, data curation, writing, original draft preparation, writing—review and editing, visualization, project administration. J.R.: Data curation, writing—review and editing, project administration. J.S.: Methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing, original draft preparation, writing—review and editing. P.V.: Data curation, writing—review and editing, visualization. S.M.M.: Data curation, writing—review and editing, project administration. S.Z.: Data curation, writing—review and editing, visualization. R.S.: Data curation, writing—review and editing, visualization.

Competing interests

Catherine Egan and Adnan Tufail received a financial grant from the National Institute for Health Research (NIHR) Biomedical Research Centre, Moorfields Eye Hospital; NHS Foundation Trust; and UCL Institute of Ophthalmology. Adnan Tufail is employed as a consultant for Heidelberg Engineering and Optovue. The funding organizations had no role in the design or conduct of this study. Richard Spaide is a consultant for Topcon and Heidelberg. Richard Spaide holds the patent for Frangi vessel segmentation. Outside of this work and without any influence on the conduct or submission of this study, Javier Zarranz-Ventura has been a consultant from Alcon, Alimera Science, Allergan, Bausch & Lomb, Bayer, Brill Pharma, DORC, Novartis, and Roche; is a grant holder in Allergan and Novartis; and has been a lecturer for Topcon and Zeiss. Peter Maloca has been a consultant for Zeiss Forum. He is consultant for Roche, Bayer, Medicon, VisionAI (Switzerland), Heidelberg Engineering (Germany), and Bayer (UK). Peter Maloca holds patents for speckle denoising and machine learning. The other authors of this paper declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07439-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.M.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

9.2 ARTÍCULO 2

Feu-Basilio S, Maloca PM, Hasler P, Scholl HPN, Marin-Martinez S, Rosinés-Fonoll J, Suarez-Valero X, Reich M, Lange C, Egan C, Zweifel S, Tufail A, Spaide RF, Zarranz-Ventura J.

Retinal vessel volume reference database derived from volume-rendered optical coherence tomography angiography.

Sci Rep. 2024;14(1):2721.

Factor de impacto (2023): 3.8 Journal Citation Report (JCR)

Primer cuartil (25/134, MULTIDISCIPLINARY SCIENCES), JCR 2023

DOI: [10.1038/s41598-024-53000-8](https://doi.org/10.1038/s41598-024-53000-8)

PMID: [38302574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38302574)

RESUMEN

Introducción: La angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCTA) permite la reconstrucción tridimensional de los vasos sanguíneos funcionales de la retina, facilitando así la cuantificación de parámetros tridimensionales de los vasos retinianos, como el volumen vascular (VV). A pesar del uso generalizado de OCTA, hasta la fecha no se han publicado datos representativos del VV.

Objetivo: Desarrollar y publicar la primera base de datos de VV a partir de reconstrucciones tridimensionales de OCTA en sujetos sanos.

Métodos: En este estudio, se procesaron cubos maculares de OCTA de 3×3 mm utilizando técnicas de generación de volumen para medir el VV en 203 ojos de 107 voluntarios sanos. Se aplicaron modelos lineales generalizados (GLM) para evaluar el impacto de la edad, el sexo, la agudeza visual (VA), el equivalente esférico (SE) y la longitud axial sobre VV.

Resultados: El VV medio global fue de $0,23 \pm 0,05 \text{ mm}^3$. Se observó una correlación negativa entre el VV y la edad y longitud axial. Sin embargo, el análisis del modelo GLM indicó que la longitud axial ejerce la influencia más pronunciada sobre VV. No se detectaron asociaciones estadísticamente significativas con el género o entre los ojos izquierdo y derecho.

Conclusiones: Este es el primer estudio que evalúa el VV obtenido a partir de reconstrucciones tridimensionales de OCTA y sus variaciones naturales en una amplia serie de sujetos sanos. Proporciona conocimientos novedosos sobre la caracterización de la anatomía vascular retiniana normal en individuos sanos, lo que representa una valiosa referencia para futuras investigaciones en este campo.



OPEN Retinal vessel volume reference database derived from volume-rendered optical coherence tomography angiography

Silvia Feu-Basilio^{1,12}, Peter M. Maloca^{2,3,4,12}, Pascal Hasler², Hendrik P. N. Scholl^{2,3}, Sara Marin-Martinez¹, Josep Rosinés-Fonoll¹, Xavier Suarez-Valero¹, Michael Reich^{5,6}, Clemens Lange^{5,7}, Catherine Egan⁴, Sandrine Zweifel^{8,9}, Adnan Tufail⁴, Richard F. Spaide¹⁰ & Javier Zarranz-Ventura^{1,4,11}✉

Optical coherence tomography angiography (OCTA) enables three-dimensional reconstruction of the functional blood vessels in the retina. Therefore, it enables the quantification of 3D retinal vessel parameters such as surface area and vessel volume. In spite of the widespread use of OCTA, no representative volume-rendered vessel volume (VV) data are published to date. In this study, OCTA 3 × 3 mm macular cubes were processed with volume-rendering techniques to measure VV in 203 eyes from 107 healthy volunteers. Generalized linear models (GLM) were constructed to assess the impact of age, gender, visual acuity (VA), spherical equivalent (SE), and axial length (AL) on VV. Overall mean VV was $0.23 \pm 0.05 \text{ mm}^3$. Age and axial length showed a negative correlation with VV. However, GLM model analysis found that AL exerted the most pronounced influence on VV. No statistically significant associations were identified between gender or between left and right eyes. This is the first study to assess 3D OCTA VV and its naturally occurring variations in a large series of healthy subjects. It offers novel insights into the characterization of normal retinal vascular anatomy in healthy individuals, contributing to a valuable reference for future research in this field.

Optical coherence tomography angiography (OCTA) is an imaging technique that uses the variation in signal intensity caused by moving blood particles, such as erythrocytes, as the contrast mechanism for the visualization of functional blood vessels in the eye^{1,2}. Therefore, OCTA enables the reconstruction of retinal microvascular flow maps, as a beneficial imaging tool in a series of microvascular pathologies, such as diabetic retinopathy^{3,4}. In diabetic retinopathy, OCTA has helped to document disease progression and to assess risk stratification by providing two-dimensional capillary perfusion density maps for the quantification of the superficial and deep capillary layers. The quantification of the rich granular data provided by OCTA images has made it possible to expand a further field of research allegedly called OCTA angiolitics⁵. In addition, OCTA metrics of the retinal vasculature allows investigating the correlation of these findings with microvascular damage in other organs such as the kidney or the previous glycemic control^{6–8}.

¹Hospital Clínic de Barcelona, University of Barcelona, Carrer de Sabino Arana, 1, 08028 Barcelona, Spain. ²Institute of Molecular and Clinical Ophthalmology Basel, 4031 Basel, Switzerland. ³Department of Ophthalmology, University Hospital Basel, 4031 Basel, Switzerland. ⁴Moorfields Eye Hospital NHS Foundation Trust, London EC1V 2PD, UK. ⁵Faculty of Medicine, Eye Center, Albert-Ludwig University Freiburg, 79085 Freiburg, Germany. ⁶Augenärzte Am Städel, Hans-Thoma-Strasse 24, 60596 Frankfurt Am Main, Germany. ⁷Department of Ophthalmology, St. Franziskus Hospital, 48145 Münster, Germany. ⁸Department of Ophthalmology, University Hospital Zurich, 8006 Zurich, Switzerland. ⁹University of Zurich, 8006 Zurich, Switzerland. ¹⁰Vitreous, Retina, Macula Consultants of New York, New York, NY, USA. ¹¹Institut de Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain. ¹²These authors contributed equally: Silvia Feu-Basilio and Peter M. Maloca. ✉email: zarranz@clinic.cat

However, although OCTA by itself is a three-dimensional imaging technique, for the purpose of comprehensibility, most commercial instruments offer a limited two-dimensional-en face-representation of OCTA data. The latter is the display method most currently provided for both clinical practice and clinical research^{2,9–11}. En face imaging might be more handy, but it actually only depicts a small portion of the real-world volume data of retinal vessels. This can result in the underestimation of tissue perfusion, lack of visualization of true flow or misinterpretation due to segmentation errors for specific layers within the retina¹².

Volume rendering of the underlying three-dimensional OCTA data is an exciting avenue of research, avoiding many of these problems as it allows visualization of all layers of flow in the retina, comprehending the spatial interrelationship between certain lesions¹². In other words, volume-rendered OCTA enables to further adequately model the physical characteristics of the retinal vessel architecture which is not made possible with previous retinal imaging modalities such as invasive fundus fluorescein angiography or indocyanine green angiography. The detectable 3D OCTA volume of retina blood vessels refers largely to the total space occupied by the blood within the vessel^{13,14}. This volume can vary depending on the type of vessel (artery, vein, capillary) and its size^{13,14}. Arteries, which carry blood away from the heart, typically have a smaller volume compared to veins, which return blood to the heart. This is because arteries have thicker walls and a smaller lumen (inner space) relative to their outer diameter. Capillaries, on the other hand, are the smallest and most numerous blood vessels. They have a tiny volume individually, but their collective volume is substantial due to their sheer number. There is an inverse correlation between the surface area⁹ and the volume of blood vessels. As blood vessels branch into smaller vessels (arteries to arterioles to capillaries), their total surface area increases dramatically, while their total volume decreases. In this context, it is worth to note that the relationship between the vessel surface area and volume of blood vessels is an important consideration in biology and physiology, as it has significant implications for the exchange of gases, nutrients, and waste products within the circulatory system².

Therefore, the aim of this study was to investigate the natural variation of VV in a relatively large healthy cohort and to determine its association with the demographic features and a series of clinically relevant characteristics (i.e. sex, age, spherical equivalent -SE-, axial length -AL- and visual acuity -VA-).

Results

Summary statistics and data plots

The OCTA measurements from 203 eyes (102 left and 101 right eyes) of 107 subjects (61.7% female) could be included, being 97.5% of the eyes phakic. Twenty-three eyes were excluded because of the presence of coronary heart disease ($n=2$), peripheral vascular disease ($n=10$), high myopia ($n=2$), amblyopia ($n=6$), or cataract ($n=3$).

The summary statistics are presented in Table 1 and the data are plotted in Fig. 1. Overall mean VV was 0.23 mm^3 (SD 0.05). The distribution of VV values ranged from 0.10 to 0.35 mm^3 . To avoid correlation effects between the eyes, further results are separated by right and left eyes. All the measured raw data are summarized in Supplementary raw data (S1) (right eyes) and Supplementary raw data (S2) (left eyes).

Correlation analysis

Pearson correlation coefficients between VV and age were -0.11 and -0.20 for right and left eyes, respectively. Testing for non-correlation revealed no significant correlation in right eyes ($p=0.257$) but a significant negative correlation in left eyes ($p=0.041$).

Pearson correlation coefficients between VV and AL were -0.19 and -0.29 with p -values 0.063 and 0.004 in right and left eyes, respectively.

Generalized linear model (GLM) analysis

GLM models were constructed to evaluate the effects of ocular parameters (age, sex, AL and VA) on VV. Results (Table 2) showed that the main effect of AL had a significant effect on VV on both left ($p<0.01$) and right eyes

	Age	SE	AL	VA	VV overall	VV male left	VV female left	VV male right	VV female right
Count	203	197	200	202	203	39	63	36	65
Mean	43.39	-0.41	23.8	0.97	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
Std	14.05	2.04	1.03	0.07	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05
Min	19.37	-5.75	21.59	0.60	0.10	0.16	0.14	0.13	0.10
25%	31.08	-1.38	23.07	0.95	0.19	0.21	0.19	0.20	0.19
50%	41.25	-0.25	23.68	1.00	0.23	0.22	0.23	0.23	0.24
75%	56.84	0.5	24.49	1.00	0.27	0.25	0.27	0.27	0.27
Max	73.49	5.59	26.92	1.00	0.35	0.31	0.35	0.31	0.33

Table 1. Summary statistics of total retinal vessel volume and parameters. Summary statistics are calculated from 203 eyes (102 left and 101 right). Count indicates the number of eyes for which the respective measurements were available. Mean, std, min, 25%, 50%, 75% and max indicate mean, standard deviation, minimum, 1st quartile, 2nd quartile, 3rd quartile, and maximum, respectively. Age is measured in years. SE, spherical equivalent (diopters); AL, axial length (mm); VA, visual acuity (decimal scale); VV, OCTA vessel volume (mm^3).

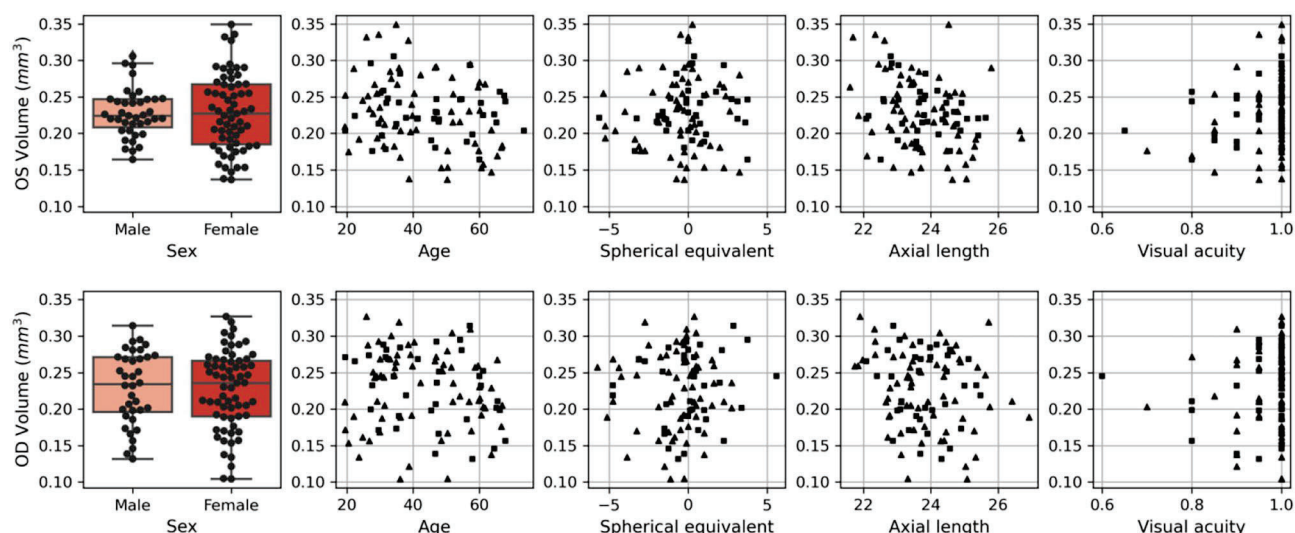


Figure 1. Univariate box plots and scatter plots of 3D OCTA vessel volume metrics. Plots in the first row are based on data from the left eyes (OS). Plots in the second row are based on data from the right eyes (OD). Boxplots are grouped by sex. Scatter plots are drawn for age, spherical equivalent, axial length, and visual acuity. Males (females) are indicated by squares (triangles) in the scatter plots. Optical coherence tomography angiography retinal vessel volume measurements are in mm^3 .

Effect	Right eyes			Left eyes		
	F value	Pr (> F)	Sign	F value	Pr (> F)	Sign
Age	0.4551	0.50186		2.1512	0.1463308	
Sex	0.2747	0.60161		0.9389	0.3354543	
SE	0.0805	0.77736		1.2825	0.2607822	
AL	4.0088	0.04861	*	13.6097	0.0004061	***
VA	0.6588	0.41935		4.355	0.0400442	*
Age:Sex	3.0123	0.08644		2.0743	0.1536501	
Age:SE	0.4186	0.51946		0.3454	0.5583766	
Age:AL	0.3268	0.56916		0.292	0.5904485	
Age:VA	0.0697	0.79244		0.2403	0.6253133	
Sex:SE	4.4824	0.03731	*	0.7343	0.3940192	
Sex:AL	2.0398	0.15708		0.9675	0.328236	
Sex:VA	0.025	0.8747		0.0207	0.8859757	
SE:AL	0.5212	0.47242		0.03	0.8629057	
SE:VA	0.2447	0.62218		0.0358	0.8503498	
AL:VA	0.4269	0.51538		0.1837	0.6693748	

Table 2. Generalized linear model (GLM) analysis results. A GLM analysis was performed for the left and right eyes separately. The main effects of the independent variables, age, sex, spherical equivalent (SE), axial length (AL), and visual acuity (VA), and all the possible two-way interactions are showed. p -values were calculated using the F-test statistic. The “Sign” columns indicate significance codes: 0, “***”; 0.001, “**”; 0.01, “*”; 0.05; and 0.1, 1.

($p < 0.05$). For the left eyes only, the main effect of VA had a significant effect ($p < 0.05$) on VV. On the other hand, a two-way interaction, sex: SE, was found to have a significant effect ($p < 0.05$) on right eyes only. No other effects and two-way interactions were significant in either eye at a significance level of 0.05.

Right vs left eyes

A paired two-sided t -test on VV was performed to assess whether there was a significant difference in left vs right eyes. The result was p -value of 0.70 (value of t -test statistic, 0.38). Therefore, it was concluded that there was no significant difference in VV between the left and right eyes.

Correlation analysis between surface and volume

Our group previously studied 3D OCTA total surface area (i.e. vessel surface) using the same automatic technology for 3D rendering of OCTA and the same population sample as in this study⁹. We performed a correlation

analysis between Surface and VV. Pearson correlation coefficients between vessel surface and VV were 0.98 in left eyes and 0.99 in right eyes.

Discussion

This study reports a normative database of VV in healthy controls and describes that this novel biomarker shows existing associations with age and ocular parameters such as axial length in healthy subjects. Interestingly, we observed that even within this healthy and relatively large cohort, natural variations in VV of over 30 per cent were already detected. These results reinforce the notion that when recruiting for OCTA studies, attention must be paid to the composition of the participants to avoid bias in the results due to natural fluctuations.

OCTA is an imaging technique that is revolutionizing the diagnosis and monitoring of multiple ophthalmologic diseases. The reason why retinal vessel volumes are important in the current study can be challenged. Previous methods such as FA or ICG have demonstrated their usefulness for clinical practice but never reveal the entire vessel architecture. Also, they only provide qualitative values of the vasculature so that a comparative assessment is difficult due to the lack of quantifiability. In the former two-dimensional OCTA method, the quantification of the vessels is based only on measurements of their 2D images, causing that only a small part of a vessel can be measured effectively since vessels are three-dimensional elements. In contrast, the current study allows the measurement of the OCTA derived endoluminal blood flow in three-dimensions, which makes possible in a previously unimagined approximation to effectively assess naturally existing vessel structures. Thus, both elements, OCTA VV and OCTA vessel surface may be useful parameters in the future, as it is possible that certain disease processes may attack them differently^{2,15}. For example, in diabetic retinopathy, it is conceivable that as a result of the loss of pericytes, the vessel surface may be affected differently than the vessel volume.

These results may offer further insights in the microvascular status of the retinal vessels, beyond the standard 2D metrics commonly used to date in clinical care and research as reported in the literature. OCTA demonstrated promise in various retinal diseases such as diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, and retinal vascular occlusions, and also was proven useful in anterior segment and optic nerve related alterations^{1,3,4,6,10–12,16–18}. However, most of these studies were carried out using the standard two-dimensional en face representation. As previously described, the concept of providing only 2D OCTA data reflects only a reduced capability of data representation, as retinal vessels are by themselves three-dimensional structures^{2,9}. The relevance of volume rendering techniques lie in the possibility to bring along novel three-dimensional parameters to study the status of the retinal microvasculature, such as vessel surface or VV, which can be altered differentially in multiple diseases such as diabetic retinopathy or Stargardt disease^{2,15}. The goal of this study was to highlight the role of 3D OCTA as an objective tool to broaden our understanding of the retina by using volume rendering of OCTA cubes to measure VV in a large series of healthy subjects and assessing its naturally occurring variations.

To our knowledge this is the first study to measure 3D OCTA VV in such a large series of healthy subjects. Indeed, this parameter has only been previously reported in short series of healthy subjects^{2,19,20}. Maloca et al.² studied 26 eyes of 13 healthy individuals (all female) and reported an overall average VV of $0.49 \pm 0.09 \text{ mm}^3$. Borrelli et al.¹⁹ analyzed 15 eyes of 15 healthy subjects (all female) and found a mean VV of $0.32 \pm 0.05 \text{ mm}^3$, and in a different study examined 35 eyes of healthy controls (19 females) and presented a mean VV of $0.29 \pm 0.04 \text{ mm}^3$ ²⁰. Such different results in mean VV may be due to the small sample size used in these studies and its lesser representativeness with the general population (in the first two cited papers healthy subjects were all female). All compared their results with short series of diabetic patients and found that VV was reduced in diabetic patients. However, correlations of VV with ocular parameters of interest such as age, sex, VA, SE or AL were not explored in these studies.

We explored potential associations of 3D OCTA VV with demographics and clinical parameters recorded in our series. We observed a significant negative correlation between VV and age and AL, consistently demonstrated regardless of eye laterality for right and left eyes. This association remained significant for AL after controlling for potential confounders in the GLM analysis. This finding suggests that VV is directly correlated with the AL of the studied eyes and highlights the relevance of reporting this specific data simultaneously to VV, as this may reflect possible magnification effects that may influence the 3D OCTA metrics provided.

These findings are in accordance with the correlation and GLM analyses conducted in our previous paper investigating vessel surface in 3D OCTA cube scans using the same automatic technology for 3D rendering of OCTA and population sample as in the present study⁹. In this report, we evaluated the effect of AL, VA, SE, sex and age on 3D OCTA total vessel surface area. Similar to the main findings reported here, AL showed a significant association with the total vessel surface observed in healthy eyes. Due to the strong association and high magnitude of the correlation observed in both cases, VV and vessel surface seem to behave in a similar fashion and should be considered reliable 3D OCTA parameters to describe the microvascular status of healthy patients.

This study has a number of limitations. First, our study cohort includes a limited series of relatively young patients, which may have tampered our ability to identify potential physiological changes in VV due to aging. Our series also presented a slight female preponderance, which may have also affected the inter-gender comparison although the data do not suggest any impact of sex. Second, OCTA data cubes were exported as raw files so projection artifact removal²¹ was not provided by the manufacturer's software. Third, a possible ocular magnification effect may have influenced the measurements provided. There are no published international standards to control for this factor, and some approximations have been conducted using the axial length as covariable^{22,23}. To investigate further this matter, we conducted a specific analysis with a correction based on Littmann's method and Bennett's formula, detailed in the Supplementary raw data S1 and S2. And fourth, no reproducibility test was specifically conducted for the current VV measurements performed in this study. However, the reproducibility of the volume rendering OCTA method employed has been previously validated² and is comparable to standard enface OCTA methods^{24,25}.

In summary, blood vessels are structured to maximize surface area for efficient exchange while minimizing volume to maintain pressure and flow. This arrangement is essential for the proper functioning of the circulatory system and the delivery of oxygen and nutrients to cells throughout the body. This study shows for the first time in a large number of healthy subjects that 3D OCTA can approximate the effective retinal blood column and that a relatively large natural variability has to be taken into account. We provide objective data about the normal variation of VV metrics observed in a large series of healthy subjects, and investigate its correlation with clinical parameters of interest such as age, sex, VA, SE and AL. The clinical value of this parameter will be investigated in future studies directed to evaluate its relevance and potential implications in the pathophysiology of different retinal diseases, such as diabetic retinopathy.

Methods

Study design and study protocol

Cross sectional, exploratory study of a control cohort recruited prospectively in a 24-month period with collection of OCTA images and relevant ocular and systemic clinical data as part of a larger prospective OCTA trial (ClinicalTrials.gov, trial number NCT03422965)¹⁶. This project was approved by the Institutional Review Board of Hospital Clinic of Barcelona (HCB/2016/0216). Written informed consent was obtained for all participants. All research was performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Inclusion and exclusion criteria

Controls were collected from healthy volunteers recruited in the general population after social media campaigns supported by the Communications department of the hospital. Inclusion criteria were age over 18 years in both sexes, ability to follow instructions and to consciously sign informed consent. Exclusion criteria include concomitant ocular pathology, macular edema, presence of macular cysts, previous ocular surgery, previous macular laser, previous ocular treatment including intravitreal therapy, media opacities and inability to perform complete ocular examinations including retinal imaging (OCT, OCTA, fundus retinographies, biometry, etc.), as well as inability to give written informed consent to participate in the study.

Data collection

All participants underwent a complete ocular examination, as described elsewhere¹⁶. Relevant ocular clinical data collected included best-corrected visual acuity (BCVA), spherical equivalent, slit-lamp biomicroscopy, intraocular pressure measurement, retinal fundus exam and axial length (IOL Master 500, Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA). Systemic clinical data collected included age, sex, smoking habit, systolic and diastolic blood pressure, height, weight, body mass index (BMI). A comprehensive battery of OCT and OCTA images was captured using the Cirrus OCT device (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA) and included an OCTA $3 \times 3 \times 2$ mm macular scan. OCTA and structural OCT quantitative parameters were determined using the built-in commercial software (Angioplex Metrics) and included vessel density (VD), perfusion density (PD), foveal avascular zone (FAZ) area, perimeter and circularity, central retinal thickness (CRT), macular volume (MV) and average retinal thickness (ART).

Image analysis and 3D volume rendering

Original raw 3×3 mm OCTA cubes data were exported from the OCT device as proprietary data in .img image format using the built-in manufacturer's software, which did not allow for direct projection artifact removal. Using a custom written script, images were automatically converted as en face .bmp sequence. Image post-processing included an automatic script written in Matlab R2017a (MathWorks Inc., Natick, USA) to separate the retinal flow signal and make it suitable for measurement of the total three-dimensional vessel volume (Fig. 2). Details of this method, including its reproducibility, have been previously published by our group².

Statistical analysis

Qualitative variables were described using absolute frequencies and percentages. The description of quantitative variables was performed using the mean, standard deviation (SD), minimum, 1st quartile, 2nd quartile, 3rd quartile, and maximum. Summary statistics were calculated in Python v3.8²⁶ with pandas v1.1²⁷ and boxplots were generated in Python with Matplotlib v3.3²⁸. To account for possible ocular magnification effect, a specific analysis with a correction based on Littmann's method and Bennett's formula^{22,23} was also performed, detailed in Supplementary raw data S1 and S2. Pearson correlation coefficients were investigated for right and left eyes separately and calculated in Python v3.8 with scipy v1.6²⁹. Generalized linear models were created to evaluate potential existing relationships between VV and ocular parameters of interest. The GLM analysis was performed, on the left and right eyes separately, in R v3.6³⁰ with car v3.0³¹ using the type II sum of squares estimation method. For all the tests, p -values < 0.05 were considered statistically significant.

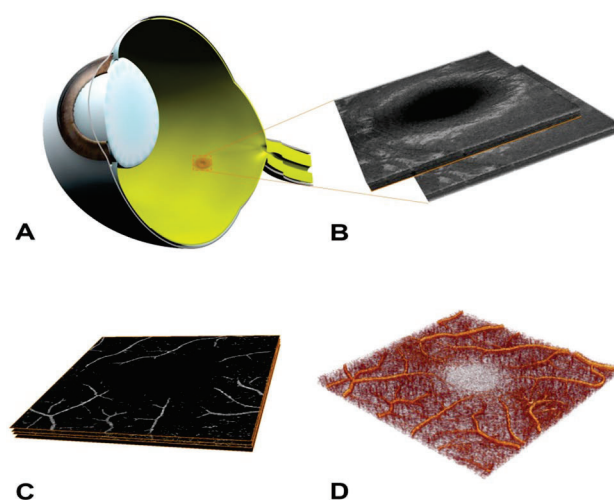


Figure 2. Image processing of 3D volume-rendered OCTA method. Quantification of vessel volume from 3D-volume rendering OCTA cube reconstructions. **(A)** The OCT scan beam was centered over the fovea. **(B)** Multiple volumes were obtained from the OCT scan and the OCTA cross-sectional images were created using the manufacturer's software **(C)**. From these, a volume rendered OCTA was produced **(D)** so that the OCTA vessel volume could be calculated per volume. This figure has been produced with Cinema 4D Release 20 (Build RB255810, licence 14004015757-XRPV, Maxon Computer GmbH, Bad Homburg, Germany, and finalised with Adobe Photoshop (Creative Cloud, Version 25.3.1, Licence ID C5004899101EDCH, Adobe Systems Incorporated, San Jose, US).

Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study are available in Supplementary raw data S1 for the right eyes and Supplementary raw data S2 for the left eyes.

Received: 12 November 2023; Accepted: 25 January 2024

Published online: 01 February 2024

References

- Kashani, A. H. *et al.* optical coherence tomography angiography: A comprehensive review of current methods and clinical applications. *Prog. Retin. Eye Res.* **60**, 66–100 (2017).
- Maloca, P. M. *et al.* Novel biomarker of sphericity and cylindricity indices in volume-rendering optical coherence tomography angiography in normal and diabetic eyes: A preliminary study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **258**, 711–723 (2020).
- Hwang, T. S. *et al.* optical coherence tomography angiography features of diabetic retinopathy. *Retina* **35**, 2371–2376 (2015).
- Barraso, M. *et al.* Optical coherence tomography angiography in Type 1 diabetes mellitus. Report 1: Diabetic retinopathy. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **9**, 34–34 (2020).
- Kalra, G. *et al.* Optical coherence tomography (OCT) angiolytics: A review of OCT angiography quantitative biomarkers. *Surv. Ophthalmol.* **67**, 1118–1134 (2022).
- Agemy, S. A. *et al.* Retinal vascular perfusion density mapping using optical coherence tomography angiography in normals and diabetic retinopathy patients. *Retina* **35**, 2353–2363 (2015).
- Alé-Chilet, A. *et al.* Optical coherence tomography angiography in Type 1 diabetes mellitus-report 2: Diabetic kidney disease. *J. Clin. Med.* **11**, 197 (2021).
- Bernal-Morales, C. *et al.* Optical coherence tomography angiography in Type 1 diabetes mellitus. Report 4: Glycated haemoglobin. *Diagnostics* **11**, 1537 (2021).
- Maloca, P. M. *et al.* Reference database of total retinal vessel surface area derived from volume-rendered optical coherence tomography angiography. *Sci. Rep.* **12**, 3695 (2022).
- Koustenis, A. *et al.* Optical coherence tomography angiography: An overview of the technology and an assessment of applications for clinical research. *Br. J. Ophthalmol.* **101**, 16–20 (2017).
- Tan, A. C. S. *et al.* An overview of the clinical applications of optical coherence tomography angiography. *Eye* **32**, 262–286 (2018).
- Spaide, R. F., Fujimoto, J. G., Waheed, N. K., Sadda, S. R. & Staurengi, G. Optical coherence tomography angiography. *Prog. Retin. Eye Res.* **64**, 1–55 (2018).
- Spaide, R. F. Volume-rendered optical coherence tomography of diabetic retinopathy pilot study. *Am. J. Ophthalmol.* **160**, 1200–1210 (2015).
- Spaide, R. F., Klancnik, J. M. & Cooney, M. J. Retinal vascular layers imaged by fluorescein angiography and optical coherence tomography angiography. *JAMA Ophthalmol.* **133**, 45–50 (2015).
- Reich, M. *et al.* Negative vessel remodeling in Stargardt disease quantified with volume-rendered optical coherence tomography angiography. *Retina* **41**, 1948–1957 (2021).
- Zarranz-Ventura, J. *et al.* Evaluation of microvascular changes in the perifoveal vascular network using optical coherence tomography angiography (OCTA) in Type I diabetes mellitus: A large scale prospective trial. *BMC Med. Imaging* **19**, 1–6 (2019).
- Schneider, E. W. & Fowler, S. C. Optical coherence tomography angiography in the management of age-related macular degeneration. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **29**, 217–225 (2018).
- Sambhav, K., Grover, S. & Chalam, K. V. The application of optical coherence tomography angiography in retinal diseases. *Surv. Ophthalmol.* **62**, 838–866 (2017).

19. Borrelli, E. *et al.* Quantification of diabetic macular ischemia using novel three-dimensional optical coherence tomography angiography metrics. *J. Biophotonics* **13**, e202000152 (2020).
20. Borrelli, E. *et al.* Volume rendered 3D OCTA assessment of macular ischemia in patients with Type 1 diabetes and without diabetic retinopathy. *Sci. Rep.* **11**, 19793 (2021).
21. Spaide, R. F., Fujimoto, J. G. & Waheed, N. K. Image artifacts in optical coherence angiography. *Retina* **35**, 2163 (2015).
22. Littmann, H. Zur Bestimmung der wahren Grösse eines Objektes auf dem Hintergrund des lebenden Auges [Determination of the real size of an object on the fundus of the living eye]. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* **180**, 286–289 (1982).
23. Bennett, A. G., Rudnicka, A. R. & Edgar, D. F. Improvements on Littmann's method of determining the size of retinal features by fundus photography. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **232**, 361–367 (1994).
24. Lei, J. *et al.* Repeatability and reproducibility of superficial macular retinal vessel density measurements using optical coherence tomography angiography en face images. *JAMA Ophthalmol.* **135**, 1092 (2017).
25. Lee, J. C. *et al.* Intra-session repeatability and inter-session reproducibility of peripapillary OCTA vessel parameters in non-glaucomatous and glaucomatous eyes. *Br. J. Ophthalmol.* **105**, 1534 (2021).
26. Van Rossum, G. & Drake, F. L. *Python 3 Reference Manual* (CreateSpace, 2009).
27. McKinney, W. Data structures for statistical computing in python. in *Proc. 9th Python Sci. Conf.* <https://doi.org/10.25080/majora-92bf1922-00a> (2010).
28. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Comput. Sci. Eng.* **9**, 90–95.
29. Virtanen, P. *et al.* SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods* **17**, 261–272 (2020).
30. Team, R. C. R: A language and environment for statistical computing (2014).
31. Hayden, R. W. A review of: “An R companion to applied regression”, second edition, by J. Fox and S. Weisberg”. *J. Biopharm. Stat.* **22**, 418–419 (2012).

Author contributions

S.F.B: Formal analysis, investigation, data curation, writing, original draft preparation, writing—review and editing, visualization, project administration. P.M.M.: Conceptualization, methodology, software, validation, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing, original draft preparation, writing—review and editing, visualization, project administration. P.H.: Data curation, writing—review and editing, visualization. H.P.N.S.: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing, original draft preparation, writing—review and editing, visualization, project administration. S.M.M.: Data curation, writing—review and editing, project administration. J.R.: Data curation, writing—review and editing, project administration. X.S.V.: Data curation, writing—review and editing, project administration. M.R.: Data curation, writing—review and editing, visualization. C.L.: Data curation, writing—review and editing, visualization. C.E.: Data curation, writing—review and editing, visualization. S.Z.: Data curation, writing—review and editing, visualization. A.T.: Data curation, writing—review and editing, visualization. R.F.S.: Data curation, writing—review and editing, visualization. J.Z.V.: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing, original draft preparation, writing—review and editing, visualization, project administration.

Funding

This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and co-funded by the European Union (Project PI21/01384, PI: Javier Zarranz-Ventura).

Competing interests

Peter Maloca has been a consultant for Zeiss Forum. He is consultant for Roche, Bayer, Medicon, VisionAI (Switzerland), Heidelberg Engineering (Germany), and Bayer (UK). Peter Maloca holds patents for speckle denoising and machine learning. Catherine Egan and Adnan Tufail received a financial grant from the National Institute for Health Research (NIHR) Biomedical Research Centre, Moorfields Eye Hospital; NHS Foundation Trust; and UCL Institute of Ophthalmology. Adnan Tufail is employed as a consultant for Heidelberg Engineering and Optovue. The funding organizations had no role in the design or conduct of this study. Richard Spaide is a consultant for Topcon and Heidelberg. Richard Spaide holds the patent for Frangi vessel segmentation. Outside of this work and without any influence on the conduct or submission of this study, Javier Zarranz-Ventura has been a consultant from Alcon, Alimera Science, Allergan, Bausch & Lomb, Bayer, Brill Pharma, DORC, Novartis, and Roche; is a grant holder in Allergan and Novartis; and has been a lecturer for Topcon and Zeiss. The other authors of this paper declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53000-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.Z.-V.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

10. DISCUSIÓN

El objetivo de esta Tesis Doctoral es generar una base de datos de normalidad de nuevos parámetros vasculares derivados de la reconstrucción tridimensional de cubos de angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCTA), una técnica relativamente nueva y no invasiva de exploración retiniana.

El estudio minucioso de las características y parámetros vasculares de la retina es importante ya que consta de una anatomía vascular compleja y única, con la mayoría de sus vasos formando parte de la microcirculación. (1) Esta última es la encargada de regular el flujo sanguíneo y la presión de perfusión tisular para optimizar el intercambio de metabolitos como nutrientes y oxígeno entre la sangre y el tejido. (2,3,53) Además, la retina permite la visualización directa y no invasiva de su microvasculatura. Esto es clínicamente relevante ya que pequeñas alteraciones en la microcirculación pueden provocar perturbaciones en el metabolismo energético, (54) que se observan en patologías no solo retinianas sino también neurológicas y sistémicas. (41,43,44) Por lo tanto, la retina ofrece un entorno único para la caracterización de múltiples enfermedades a través del estudio de su microcirculación. (41,42,55)

Dos parámetros vasculares tridimensionales importantes en el estudio de la microcirculación retiniana son el área de superficie vascular y el volumen vascular total. Por un lado, el área de superficie vascular, o área de superficie total de los vasos retinianos, representa el área disponible para el intercambio de sustancias entre la sangre y los tejidos, y es directamente proporcional a la cantidad de sustancia que se intercambia por unidad de tiempo. Además, se puede regular según las necesidades metabólicas. De hecho, frente a una mayor demanda metabólica, cuando es necesario proporcionar más nutrientes al tejido, se puede aumentar la cantidad de una sustancia que se intercambia entre la sangre y el tejido aumentando el área de superficie vascular. Esto se consigue abriendo más capilares presentes anatómicamente para su perfusión (en condiciones basales solo alrededor del 30-50% de los capilares existentes en un tejido determinado se perfunde), lo que aumenta la superficie disponible para el intercambio. (53) Por tanto, el área de superficie vascular se puede entender como la

“barrera de difusión” más importante en el intercambio de oxígeno y nutrientes, (18) por lo que representa un parámetro clave del metabolismo vascular y su caracterización nos puede dar información muy valiosa sobre el estado de la microcirculación.

Por otro lado, el volumen vascular, o volumen total de los vasos retinianos, consiste en el espacio total ocupado por la sangre dentro de los vasos de la retina. En general, el volumen depende del tipo de vaso (arteria, vena, capilar) y de su tamaño. La retina está formada principalmente por vasos pertenecientes a la microvasculatura, por lo que sus vasos son mayoritariamente capilares de aproximadamente de 5 μm de diámetro y, en menor proporción, arteriolas y vénulas con un diámetro máximo de 100-200 μm . El volumen vascular juega también un papel importante en la regulación de la perfusión tisular y el intercambio de sustancias entre la sangre y los tejidos. A nivel de la microcirculación retiniana, las arteriolas pueden regular la resistencia vascular al flujo sanguíneo mediante ajustes en su volumen (vasoconstricción o vasodilatación). La vasoconstricción (disminución del volumen vascular) implica un aumento de la resistencia vascular y por ende una disminución del flujo sanguíneo. Lo contrario se observa con la vasodilatación. Estos cambios están regulados por múltiples mecanismos de control a nivel local, neurológico y hormonal. (18) Así pues, cambios en el volumen vascular pueden traducir alteraciones no solo a nivel local tisular sino también en la situación circulatoria del cuerpo, como por ejemplo alteraciones en la presión arterial o en la carga cardiovascular, entre otras.

Como se ha mencionado anteriormente, la OCTA ha revolucionado el estudio de la microvasculatura retiniana y se ha adoptado rápidamente en la práctica clínica (24) en un gran número de enfermedades oculares, como por ejemplo la retinopatía diabética, la degeneración macular asociada a la edad, las oclusiones vasculares de la retina, o incluso en alteraciones relacionadas con el nervio óptico o el segmento anterior (8,28,32,45,56–61). Además, también se está aplicando en el estudio de enfermedades neurodegenerativas (62). No obstante, la mayoría de la información disponible hoy en día se basa en estudios de OCTA que utilizan la representación bidimensional estándar. Dado que los vasos retinianos son estructuras tridimensionales, la representación tridimensional de las imágenes de OCTA (3D-OCTA) permite visualizar y estudiar mejor

la arquitectura de los vasos retinianos, (8,46–48) además de obtener nuevos parámetros cuantitativos potencialmente más adecuados. Aunque se trata de una nueva herramienta muy prometedora, existen en la actualidad pocas publicaciones que la avalen y, si bien se han hecho algunos avances con el 2D-OCTA, (63) todavía no se han establecido datos normativos de 3D-OCTA.

Esta tesis doctoral demuestra no solo que es posible generar reconstrucciones tridimensionales de los vasos de la retina a partir de imágenes de angiografía por tomografía de coherencia óptica, sino también que se pueden obtener parámetros cuantitativos tridimensionales fiables de los vasos retinianos, estableciendo por primera vez valores de referencia de estos últimos en una cohorte amplia de controles sanos.

En primer lugar, se estudió el área de superficie vascular total, obteniendo por primera vez los valores de referencia de este parámetro en una gran cohorte de sujetos sanos (203 ojos de 107 participantes). De hecho, a nuestro conocimiento, este valor solo se había estudiado previamente en sanos en una pequeña muestra piloto de 26 ojos de 13 mujeres. (27) En nuestro estudio se obtuvo un área de superficie vascular media menor ($54,53\text{mm}^2$, con un rango de 27,03 a $88,7\text{mm}^2$) que en el publicado previamente ($87,731\text{mm}^2$, con rango de 73.8212 a 109.283mm^2). En ambos estudios se generaron las reconstrucciones tridimensionales a partir de imágenes de OCTA de $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 2\text{mm}$ ($245 \times 245 \times 1024$ píxeles) y siguiendo la misma metodología de procesamiento de imágenes para obtener las reconstrucciones volumétricas y medidas de los mismos parámetros. La diferencia de los valores obtenidos podría explicarse por el pequeño tamaño muestral del primer estudio y por el hecho que sus 13 participantes eran todas mujeres. Además, la media de edad era joven (edad media 24 años, con un rango de 21 a 39 años). Por el contrario, nuestro proyecto contaba con 107 participantes, 61,7% mujeres y 38,3% hombres, con una edad media de 43 años (rango 19 a 73 años), con lo que podría ser más representativo de la población general. Cabe destacar también que en el estudio piloto no se describen criterios de exclusión, únicamente constan los criterios de inclusión (mujeres, no fumadoras, mayores de 18 años, sin antecedentes de medicación ni cirugías oftalmológicas). Por el contrario,

nuestro estudio cuenta con unos criterios de exclusión claros: presencia de diabetes, enfermedades coronarias o enfermedades vasculares periféricas; comorbilidades oculares (por ejemplo hipertensión ocular, glaucoma, etc.); ambliopía; miopía alta (definida como mayor a -6 dioptrías); y la presencia de gliosis epirretiniana u opacidades de los medios, incluida la catarata. De hecho, teniendo en cuenta estos criterios, se excluyeron un total de 23 ojos. Esto es relevante ya que los criterios de exclusión permiten reducir los valores “outlier” o atípicos, aumentando la probabilidad de producir resultados confiables y reproducibles.

Además, en nuestro estudio se analizaron por primera vez las asociaciones del área de superficie vascular con variables oculares (equivalente esférico, longitud axial, agudeza visual mejor corregida) y variables sistémicas (edad, sexo). Uno de los principales hallazgos fue la fuerte correlación (negativa) entre el área de superficie vascular y la longitud axial del ojo, confirmada por la fuerte influencia observada también en el análisis del modelo lineal generalizado (GLM). Este resultado concuerda con los de otros artículos publicados (64–66) que utilizan datos de OCTA *en face* (2D-OCTA).

En cuanto al resto de las variables, existe controversia en la literatura (basada en 2D-OCTA) sobre su efecto en la perfusión retiniana. (63,67,68) Esta polémica podría ser debida al pequeño tamaño muestral de los estudios publicados, así como a errores de segmentación del 2D-OCTA. En nuestro estudio estos factores no están presentes ya que se trata de una cohorte más amplia y la renderización volumétrica de los OCTA, aunque es técnicamente más costosa porque requiere una revisión individual de cada caso, tiene la ventaja de evitar los errores de segmentación comunes del 2D-OCTA. Se observó únicamente una ligera correlación negativa entre la edad y la superficie vascular. Curiosamente, esta fue significativa en los ojos izquierdos, pero no en los derechos. No obstante, al realizar el análisis GLM no se detectó una influencia significativa de la edad ni ninguna otra variable (a parte la longitud axial) para ninguno de los ojos. Esto podría deberse a la inclusión de otras variables explicativas en el modelo y subraya la necesidad de su incorporación conjunta para un estudio fiable de la perfusión vascular retiniana.

Con la misma metodología, en un segundo lugar se estudió el volumen vascular total en la misma muestra, obteniendo por primera vez los valores de referencia de este parámetro en una gran cohorte de sujetos sanos. El volumen vascular total obtenido de reconstrucciones tridimensionales de OCTA solo se había estudiado previamente en sanos en cohortes de pequeño tamaño. Maloca et al (18) obtuvo un volumen vascular medio de $0,49 \pm 0,09 \text{ mm}^3$ en una muestra de 26 ojos de 13 participantes sanas (todas mujeres). Borrelli et al encontró una media de $0,32 \pm 0,05 \text{ mm}^3$ en una muestra de 15 ojos de 15 sujetos sanos (todas mujeres) (69) y, en un estudio posterior, (70) reportó un volumen vascular medio de $0,29 \pm 0,04 \text{ mm}^3$ en una muestra de 35 ojos sanos (19 mujeres). En comparación, nuestro estudio obtuvo un volumen vascular medio levemente menor ($0,23 \pm 0,05 \text{ mm}^3$). La diferencia de los valores obtenidos podría explicarse por el pequeño tamaño muestral de los estudios previamente publicados,(27,69,70) en comparación con el nuestro.

A diferencia de los estudios previamente publicados sobre el volumen vascular, en nuestro segundo artículo se analizó el efecto de variables oculares y sistémicas de interés (longitud axial, agudeza visual mejor corregida, equivalente esférico, edad y sexo) sobre el volumen vascular. La edad y la longitud axial mostraron una correlación negativa con el volumen vascular. No obstante, de la misma manera que en nuestro estudio previo, al aplicar el análisis GLM se observó que la longitud axial es la variable que ejerce más influencia sobre el volumen vascular.

La gran influencia de la longitud axial sobre ambos parámetros (área de superficie vascular y volumen vascular) podría ser debida al efecto de magnificación ocular (OME). Este último hace referencia a que el tamaño real de un objeto fotografiado en el fondo de ojo depende del aumento (o magnificación) tanto de la cámara usada como del propio ojo. Se han propuesto varios métodos y fórmulas para corregir el OME, que incluyen variables como el error refractivo (71), queratometría (71–73), longitud axial (72,74), profundidad de la cámara anterior (74) y grosor del cristalino.(74) De todas ellas, se ha propuesto que la variable más importante es la longitud axial. (75,76) Nuestro trabajo sugiere, de acuerdo con la literatura (76), la importancia de presentar los valores de la longitud axial simultáneamente con los de

los parámetros vasculares estudiados, ya que pueden reflejar posibles OMEs que influenciarían los resultados obtenidos.

No obstante, aunque en las tablas suplementarias se presenta una corrección del OME para ambos parámetros basada en el método de Littmann(73) y la fórmula de Bennett (74), los datos de las variables principales y secundarias analizados en nuestro trabajo son datos “crudos”, extraídos directamente de los cubos de OCTA, a los que no se han aplicado ajustes ni correcciones por este motivo. La razón por la que no se han aplicado correcciones para el OME es simplemente que no existe consenso en la actualidad sobre qué fórmula es mejor aplicar, unido al debate sobre si las fórmulas existentes son aplicables a un entorno tridimensional. Otra ventaja de presentar los datos “crudos” es que si en un futuro se encuentra una fórmula estándar para la corrección del OME, el ajuste de los valores se podría realizar con relativa facilidad.

Por último, cabe destacar que nuestro trabajo demuestra que el área de superficie vascular y el volumen vascular se comportan de manera muy parecida. Ambos presentan una correlación negativa significativa con la longitud axial, mientras que el resto de variables estudiadas no parecen tener una influencia considerable en ellos. Esta similitud los convierte en parámetros fiables del estado microvascular en sujetos sanos, dado que parecen mantener una relación lineal robusta. Por este motivo, son de gran interés estudios futuros que evalúen cómo se comportan en condiciones patológicas, como puede ser la retinopatía diabética u otras enfermedades retinianas.

10.1 FORTALEZAS DEL ESTUDIO

La fortaleza de este estudio reside primeramente en la validación de la técnica presentada de reconstrucción tridimensional de imágenes obtenidas a partir de OCTA para establecer nuevos y fiables parámetros cuantitativos del estado microvascular de la retina en una gran cohorte de sujetos sanos. Esto es importante ya que, como explicado anteriormente, el 3D-OCTA es una prueba de imagen no invasiva, rápida, con el potencial de resolver muchas de las limitaciones del 2D-OCTA.

En segundo lugar, se trata del primer trabajo que establece una base de normalidad de los parámetros de área de superficie vascular y volumen vascular obtenidos a partir de 3D-OCTA en una cohorte de sujetos sanos. Esto es de vital importancia ya que el estudio de parámetros obtenidos de 3D-OCTA es relativamente nuevo y no se disponía, hasta ahora, de valores de referencia fiables. Estos últimos son esenciales de cara a poder, en futuros estudios, analizar los cambios que sufren estos parámetros en las diferentes enfermedades para poder establecer diagnósticos precoces e incluso estudiar si podrían actuar como biomarcadores en algunas patologías vasculares. Sin un conocimiento exhaustivo de la fisiología de la vascularización retiniana, no se pueden entender los cambios que acontecen en las diferentes patologías.

En tercer lugar, este es el primer proyecto que analiza las asociaciones de los parámetros obtenidos de 3D-OCTA con otras variables oculares y sistémicas de interés, en este caso el equivalente esférico, la agudeza visual mejor corregida, la longitud axial, edad y sexo. Esto es interesante ya que, como comentado anteriormente, se ha detectado una influencia negativa de la longitud axial sobre ambos parámetros. El desconocimiento de esta asociación podría llevar a interpretaciones erróneas, sobre todo en ausencia de este dato en estudios futuros que se centrasen exclusivamente en la OCTA sin datos oculares adicionales. Además, el hecho de que ambos parámetros no se vean influenciados por ninguna otra de las variables estudiadas infiere que se trata de parámetros robustos de la microcirculación retiniana en sujetos sanos.

Por todos estos motivos, este trabajo establece la base normativa de 2 parámetros de 3D-OCTA fiables, ampliando nuestros conocimientos sobre la microcirculación retiniana y abriendo la puerta a toda una nueva vía de investigación.

10.2 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El trabajo presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, hay una amplia variabilidad interindividual en los valores de ambos parámetros vasculares. Esto puede ser debido al hecho que la cohorte estudiada estaba formada por sujetos relativamente jóvenes (edad media de 43,39 años) y con un ligero predominio femenino (61,7%). Aunque el

análisis GLM no sugiere un impacto del sexo ni de la edad en los dos parámetros, existe la posibilidad de haber pasado por alto cambios fisiológicos debidos a ambas variables, tanto en el volumen vascular como en el área de la superficie vascular. Futuros estudios deberían prestar especial atención a la composición de las cohortes para evitar sesgos debidos a fluctuaciones naturales.

En segundo lugar, como ocurre con la visualización estándar bidimensional del OCTA, la interpretación de los hallazgos en cubos de OCTA capturados con diferentes dispositivos continuará siendo complicada ya que cada dispositivo utiliza algoritmos diferentes para la visualización del flujo microvascular. Además, como sucede con el 2D-OCTA, la calidad de la imagen y los artefactos del OCTA seguramente pueden influir en los valores obtenidos en 3D-OCTA. En un intento de mitigar parcialmente este efecto, se decidió incluir únicamente las imágenes con suficiente calidad de señal, definidas por una intensidad detectada automáticamente de forma objetiva por el aparato en cada captura (con un valor de 7 o superior, en una escala de 0-10). Si bien esta medida supone un control objetivo de la calidad de la intensidad de señal de las imágenes, la presencia de otros artefactos de captura no puede ser completamente excluida del análisis.

En tercer lugar, los datos se exportaron como archivos sin procesar, por lo que no aplicamos el software del fabricante para la eliminación de artefactos de proyección. No obstante, al tratarse de imágenes de pacientes con retinas sanas, creemos que la influencia de estos se ha podido reducir al mínimo, siendo inherentes a la propia naturaleza de la prueba. Además, como comentado anteriormente, es posible que las medidas obtenidas hayan sido influenciadas por un efecto de magnificación ocular (OME), como demuestra la influencia observada de la longitud axial sobre ambos parámetros. No obstante, en la ausencia de una corrección estándar a aplicar para el OME, el hecho de presentar los datos sin correcciones hace que su aplicación posterior sea más generalizable, sobre todo de cara a comparar nuestros resultados con estudios futuros por parte de otros autores.

En cuarto lugar, aunque no se realizó específicamente un test de reproducibilidad, la reproducibilidad del método de renderización volumétrica de OCTA empleado había sido previamente validada (27) y es comparable al OCTA *en face* estándar.(77,78) En efecto, nuestro método de medición del área de superficie y del volumen vascular total de la retina demostró un coeficiente de correlación intraclase medio de 0,845 y 0,999, respectivamente, y un coeficiente de variación dentro de la clase de 0,07 y 0,0006, respectivamente. (27) Ambas métricas nos permiten afirmar que la metodología que hemos seguido es robusta y reproducible.

10.3 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Este proyecto, muestra por primera vez que la reconstrucción tridimensional de imágenes obtenidas a partir de OCTA permite medir parámetros importantes para el metabolismo retiniano, como son el área de superficie vascular y el volumen vascular, de forma objetiva en una población sana. En efecto, para un intercambio eficiente de oxígeno y nutrientes a los tejidos, se precisa de un amplio número de capilares sanguíneos con una superficie y un volumen vascular máximos. Esto es especialmente importante en la retina, que es un órgano sensitivo con uno los metabolismos más elevados del cuerpo.(54)

Estudio de enfermedades retinianas

Son numerosas las patologías en las que podría aplicarse la medición de estos parámetros como herramientas diagnósticas. Por ejemplo, uno de los primeros cambios patológicos que se observan en la retinopatía diabética es la disminución de los pericitos de los capilares retinianos, lo que conlleva a una pérdida de la red capilar (79) que lógicamente debería conducir a una disminución del área de superficie y del volumen vascular total. Por ejemplo, de forma piloto Maloca et al (27) observaron que ambos parámetros se veían reducidos en pacientes con retinopatía diabética. En su caso, la disminución del área de superficie fue significativa, mientras que la del

volumen vascular no. Sin embargo, otros trabajos (69,70) han reportado una reducción significativa del volumen vascular en ojos de pacientes diabéticos, comparados con un grupo control sano. Además, en el caso de Borrelli et al (70) el grupo de pacientes diabéticos estaba compuesto únicamente por ojos sin signos de retinopatía diabética, por lo que obtener una diferencia significativa con los ojos sanos podría abrir la puerta al estudio del parámetro de volumen vascular como un biomarcador precoz de retinopatía diabética. No obstante, todos estos estudios constan de un tamaño muestral pequeño y deben ser validados en futuros estudios en cohortes más amplias.

Desarrollo de nuevos parámetros de 3D-OCTA

Por otro lado, la obtención de parámetros cuantitativos fiables a partir de reconstrucciones tridimensionales de OCTA que se demuestra en este trabajo abre una extensa nueva vía de investigación que permitiría obtener de manera no invasiva nuevos biomarcadores más allá de la superficie y el volumen vascular. Se han sugerido ya otros parámetros de 3D-OCTA, como por ejemplo la esfericidad y la cilindridad vascular, que han sido propuestos como prometedores posibles marcadores de progresión de la retinopatía diabética. (27,69,70) Por supuesto, son necesarios estudios futuros para poder validar estos marcadores y para encontrar otros nuevos que puedan aplicarse a otras patologías retinianas donde la 3D-OCTA ya ha demostrado su utilidad, como por ejemplo, la telangiectasia macular tipo 2, la enfermedad de Stargardt o la oclusión de vena retiniana. (47–52)

Estudio de enfermedades sistémicas: Oculómica

Además, los biomarcadores obtenidos a partir de 3D-OCTA no solo servirían para enfermedades retinianas sino que potencialmente podrían aplicarse también a multitud de patologías sistémicas, contribuyendo al nuevo y revolucionario campo de la Oculómica. Así, mediante una prueba de imagen no invasiva, rápida y coste-efectiva se podrían obtener biomarcadores de patologías vasculares sistémicas (por ejemplo, hipertensión arterial, accidentes cerebrovasculares o enfermedades coronarias), (37,38) pero también enfermedades neurológicas, psiquiátricas, hematológicas,

nutricionales, autoinmunes, infecciosas y renales, entre otras. (41,43,44) Por ejemplo, sería interesante estudiar los parámetros de área de superficie y volumen vascular en pacientes con hipertensión arterial ya que se produce una pérdida capilar debido al daño microvascular periférico, que a su vez confiere un mayor riesgo de enfermedades sistémicas como accidentes cerebrovasculares y eventos cardiovasculares.(80)

Incorporación de nuevos parámetros 3D-OCTA a modelos de inteligencia artificial

La aplicación de técnicas de inteligencia artificial y aprendizaje de las máquinas (machine learning) a datasets de imágenes retinianas es un tema de ferviente actualidad en la comunidad científica internacional. En particular, están empezando a surgir publicaciones donde se aplican estos modelos a datasets de 2D-OCTA,(81) por ejemplo para la detección de retinopatía diabética. La aparición de estos nuevos parámetros tridimensionales abre la puerta a evaluar la influencia de incorporar estos nuevos atributos a estos modelos ya existentes, en un intento de optimizar su desempeño para distintas tareas.

11. CONCLUSIONES

1. Se ha establecido por primera vez una base de datos de normalidad para los parámetros superficie y volumen vascular de la retina a partir de reconstrucciones tridimensionales de imágenes de angiografía por tomografía de coherencia óptica en individuos sanos.
2. Existe una relación entre los parámetros superficie y volumen vascular de la retina y la longitud axial en sujetos sanos. No se ha encontrado una asociación con otros parámetros oculares (equivalente esférico, agudeza visual mejor corregida).
3. No se han encontrado asociaciones entre los parámetros superficie y volumen vascular de la retina y los parámetros sistémicos evaluados (edad y sexo).

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Burns SA, Elsner AE, Gast TJ. Imaging the Retinal Vasculature. *Annu Rev Vis Sci.* 2021;7:129:129-153.
2. Li Y, Pagano PJ. Microvascular NADPH oxidase in health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2017;109:33-47.
3. Karaca Ü, Schram MT, Houben AJ, Muris DM, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction as a link between obesity, insulin resistance and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(3):382-387.
4. Bakker E, Dikland FA, van Bakel R, Andrade De Jesus D, Sánchez Brea L, Klein S, et al. Adaptive optics ophthalmoscopy: a systematic review of vascular biomarkers. *Surv Ophthalmol.* 2022;67(2):369-387.
5. Kropp M, Golubnitschaja O, Mazurakova A, Koklesova L, Sargheini N, Vo TTKS, et al. Diabetic retinopathy as the leading cause of blindness and early predictor of cascading complications-risks and mitigation. *EPMA J.* 2023;14(1):21-42.
6. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, et al. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology.* 2021;128(11):1580-1591.
7. Ferris J. Ocular Anatomy. En: Ferris J. *Basic Sciences in Ophthalmology: A self assessment text.* Segunda ed. London: BMJ Books; 1999:1-66.
8. Spaide RF, Fujimoto JG, Waheed NK, Sadda SR, Staurengi G. Optical coherence tomography angiography. *Prog Retin Eye Res.* 2018;64:1-55.
9. Scott IU, Campochiaro PA, Newman NJ, Biousse V. Retinal Vascular Occlusions. *Lancet.* 2020;396(10266):1927-1940.
10. Anand-Apte B, Hollyfield JG. Developmental anatomy of the retinal and choroidal vasculature. En: *Encyclopedia of the Eye.* 2010:9-15.
11. Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, Bailey ST, Wilson DJ, Jia Y, et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Sci Reports.* 2017;7(1):1-11.
12. Price LD, Au S, Chong NV. Optomap ultrawide field imaging identifies additional retinal abnormalities in patients with diabetic retinopathy. *Clin Ophthalmol.* 2015;9:527-531.

13. Silva PS, Cavallerano JD, Sun JK, Soliman AZ, Aiello LM, Aiello LP. Peripheral Lesions Identified by Mydriatic Ultrawide Field Imaging: Distribution and Potential Impact on Diabetic Retinopathy Severity. *Ophthalmology*. 2013 ;120(12):2587-2595.
14. Manjunath V, Papastavrou V, Steel D, Menon G, Taylor R, Peto T, et al. Wide-field imaging and OCT vs clinical evaluation of patients referred from diabetic retinopathy screening. *Eye (Lond)*. 2015;29(3):416-423.
15. Rasmussen ML, Broe R, Frydkjaer-Olsen U, Olsen BS, Mortensen HB, Peto T, et al. Comparison between Early Treatment Diabetic Retinopathy Study 7-field retinal photos and non-mydriatic, mydriatic and mydriatic steered widefield scanning laser ophthalmoscopy for assessment of diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications*. 2015;29(1):99-104.
16. Aiello LP, Odia I, Glassman AR, Melia M, Jampol LM, Bressler NM, et al. Comparison of Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Standard 7-Field Imaging With Ultrawide-Field Imaging for Determining Severity of Diabetic Retinopathy. *JAMA Ophthalmol*. 2019;137(1):65-73.
17. Attiku Y, Nittala MG, Velaga SB, Ramachandra C, Bhat S, Solanki K, et al. Comparison of diabetic retinopathy severity grading on ETDRS 7-field versus ultrawide-field assessment. *Eye (Lond)*. 2023;37(14):2946-2949.
18. Maloca PM, Feu-Basilio S, Schottenhamml J, Valmaggia P, Scholl HPN, Rosinés-Fonoll J, et al. Reference database of total retinal vessel surface area derived from volume-rendered optical coherence tomography angiography. *Sci Rep*. 2022;12(1):3695.
19. Kornblau IS, El-Annan JF. Adverse reactions to fluorescein angiography: A comprehensive review of the literature. *Surv Ophthalmol*. 2019;64(5):679-693.
20. Spaide RF, Klancnik JM, Cooney MJ. Retinal Vascular Layers Imaged by Fluorescein Angiography and Optical Coherence Tomography Angiography. *JAMA Ophthalmol*. 2015;133(1):45-50.
21. Baddam DO, Ragi SD, Tsang SH, Ngo WK. Ophthalmic Fluorescein Angiography. *Methods Mol Biol*. 2023;2560:153-160.

22. Sim DA, Keane PA, Zarranz-Ventura J, Fung S, Powner MB, Platteau E, et al. The effects of macular ischemia on visual acuity in diabetic retinopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(3):2353-2360.
23. Katkar RA, Tadinada SA, Amaechi BT, Fried D. Optical Coherence Tomography. *Dent Clin North Am*. 2018;62(3):421-434.
24. Kashani AH, Chen C-L, Gahm JK, Richter GM, Rosenfeld PJ, Shi Y, et al. Optical Coherence Tomography Angiography: A Comprehensive Review of Current Methods and Clinical Applications. *Prog Retin Eye Res*. 2017;60:66-100.
25. Zheng F, Deng X, Zhang Q, He J, Ye P, Liu S, et al. Advances in swept-source optical coherence tomography and optical coherence tomography angiography. *Adv Ophthalmol Pract Res*. 2022;3(2):67-79.
26. Yang J, Wang E, Chen Y. Swept-Source OCT of Normal Eyes. In: Chen Y, Peng X. (eds). *Atlas of Swept Source OCT and OCT Angiography*. Singapore: Springer; 2023: 33-54.
27. Maloca PM, Spaide RF, de Carvalho ER, Studer HP, W Hasler P, Scholl HPN, et al. Novel biomarker of sphericity and cylindricity indices in volume-rendering optical coherence tomography angiography in normal and diabetic eyes: a preliminary study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2020;258(4):711-723.
28. Tan ACS, Tan GS, Denniston AK, Keane PA, Ang M, Milea D, et al. An overview of the clinical applications of optical coherence tomography angiography. *Eye (Lond)*. 2018;32(2):262-286.
29. Kalra G, Zarranz-Ventura J, Chahal R, Bernal-Morales C, Lupidi M, Chhablani J. Optical coherence tomography (OCT) angiolytics: a review of OCT angiography quantitative biomarkers. *Surv Ophthalmol*. 2022;67(4):1118-1134.
30. Casselholmde Salles M, Kvanta A, Amrén U, Epstein D. Optical coherence tomography angiography in central retinal vein occlusion: Correlation between the foveal avascular zone and visual acuity. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(9):OCT242-6.
31. Koulisis N, Kim AY, Chu Z, Shahidzadeh A, Burkemper B, De Koo LCO, et al. Quantitative microvascular analysis of retinal venous occlusions by spectral domain optical coherence tomography angiography. *PLoS One*. 2017;12(4).

32. Barraso M, Alé-Chilet A, Hernández T, Oliva C, Vinagre I, Ortega E, et al. Optical Coherence Tomography Angiography in Type 1 Diabetes Mellitus. Report 1: Diabetic Retinopathy. *Transl Vis Sci Technol*. 2020;9(10):34.
33. Tang FY, Ng DS, Lam A, Luk F, Wong R, Chan C, et al. Determinants of Quantitative Optical Coherence Tomography Angiography Metrics in Patients with Diabetes. *Sci Rep*. 2017;7(1):2575.
34. Ikram MK, Cheung CY, Lorenzi M, Klein R, Jones TLZ, Wong TY. Retinal Vascular Caliber as a Biomarker for Diabetes Microvascular Complications. *Diabetes Care*. 2013;36(3):750-759.
35. Cheung CY, Ikram MK, Klein R, Wong TY. The clinical implications of recent studies on the structure and function of the retinal microvasculature in diabetes. *Diabetologia*. 2015;58(5):871-885.
36. Tan W, Yao X, Le TT, Tan ACS, Cheung CY, Chin CWL, et al. The Application of Optical Coherence Tomography Angiography in Systemic Hypertension: A Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:778330.
37. Wang L, Shah S, Llaneras CN, Goldhardt R. Insight into the Brain: Application of the Retinal Microvasculature as a Biomarker for Cerebrovascular Diseases through Optical Coherence Tomography Angiography. *Curr Ophthalmol Rep*. 2024;12(1):1-11.
38. Rusu AC, Horvath KU, Tinica G, Chistol RO, Bulgaru-Iliescu AI, Todosia ET, et al. Retinal Structural and Vascular Changes in Patients with Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Life (Basel)*. 2024;14(4):448.
39. London A, Benhar I, Schwartz M. The retina as a window to the brain-from eye research to CNS disorders. *Nat Rev Neurol*. 2013;9:44-53.
40. Silverstein SM, Keane BP, Corlett PR. Oculomics in Schizophrenia Research. *Schizophr Bull*. 2021;47(3):577-579.
41. Honavar S. Oculomics – The eyes talk a great deal. *Indian J Ophthalmol*. 2022;70(3):713.
42. Wagner SK, Fu DJ, Faes L, Liu X, Huemer J, Khalid H, et al. Insights into Systemic Disease through Retinal Imaging-Based Oculomics. *Transl Vis Sci Technol*. 2020;9(2):6.

43. Chhablani PP, Ambiya V, Nair AG, Bondalapati S, Chhablani J. Retinal Findings on OCT in Systemic Conditions. *Semin Ophthalmol.* 2018;33(4):525-546.
44. Mukherjee C, Al-Fahad Q, Elsherbiny S. The role of optical coherence tomography in therapeutics and conditions, which primarily have systemic manifestations: a narrative review. *Ther Adv Ophthalmol.* 2019;11.
45. Koustenis A, Harris A, Gross J, Januleviciene I, Shah A, Siesky B. Optical coherence tomography angiography: an overview of the technology and an assessment of applications for clinical research. *Br J Ophthalmol.* 2017;101(1):16-20.
46. Feu-Basilio S, Maloca PM, Hasler P, Scholl HPN, Marin-Martinez S, Rosinés-Fonoll J, et al. Retinal vessel volume reference database derived from volume-rendered optical coherence tomography angiography. *Sci Rep.* 2024;14(1):2721.
47. Maloca PM, Spaide RF, Rothenbuehler S, Scholl HPN, Heeren T, Ramos de Carvalho JE, et al. Enhanced resolution and speckle-free three-dimensional printing of macular optical coherence tomography angiography. *Acta Ophthalmol.* 2019;97(2):317-319.
48. Spaide RF. Volume-rendered angiographic and structural optical coherence tomography. *Retina.* 2015;35(11):2181-2187.
49. Spaide RF, Suzuki M, Yannuzzi LA, Matet A, Behar-Cohen F. Volume-rendered angiographic and structural optical coherence tomography angiography of macular telangiectasia type 2. *Retina.* 2017;37(3):424-435.
50. Spaide RF. Volume-Rendered Optical Coherence Tomography of Diabetic Retinopathy Pilot Study. *Am J Ophthalmol.* 2015;160(6):1200-1210.
51. Spaide RF. Volume-Rendered Optical Coherence Tomography of Retinal Vein Occlusion Pilot Study. *Am J Ophthalmol.* 2016;165:133-144.
52. Reich M, Dreesbach M, Boehringer D, Schottenhamml J, Gehring E, Scholl HPN, et al. Negative vessel remodeling in Stargardt disease quantified with volume-rendered optical coherence tomography angiography. *Retina.* 2021;41(9):1948-1957.
53. Pittman R. The Circulatory System and Oxygen Transport. *Regul Tissue Oxyg.* 2011;(2):32-67.

54. Country MW. Retinal metabolism: A comparative look at energetics in the retina. *Brain Res.* 2017;1672:50-57.
55. Suh A, Ong J, Kamran SA, Waisberg E, Paladugu P, Zaman N, et al. Retina Oculomics in Neurodegenerative Disease. *Ann Biomed Eng.* 2023;51(12):2708-2721.
56. Lee J, Rosen R. Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2016;16(12):123.
57. Hwang TS, Jia Y, Gao SS, Bailey ST, Lauer AK, Flaxel CJ, et al. Optical Coherence Tomography Angiography Features of Diabetic Retinopathy. *Retina.* 2015;35(11):2371-2376.
58. Agemy SA, Sripsema NK, Shah CM, Chui T, Garcia PM, Lee JG, et al. Retinal vascular perfusion density mapping using optical coherence tomography angiography in normals and diabetic retinopathy patients. *Retina.* 2015;35(11):2353-2363.
59. Zarranz-Ventura J, Barraso M, Alé-Chilet A, Hernandez T, Oliva C, Gascón J, et al. Evaluation of microvascular changes in the perifoveal vascular network using optical coherence tomography angiography (OCTA) in type i diabetes mellitus: A large scale prospective trial. *BMC Med Imaging.* 2019;19(1):1-6.
60. Sambhav K, Grover S, Chalam K V. The application of optical coherence tomography angiography in retinal diseases. *Surv Ophthalmol.* 2017;62(6):838-866.
61. Schneider EW, Fowler SC. Optical coherence tomography angiography in the management of age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol.* 2018;29(3):217-225
62. Tsokolas G, Tsaousis KT, Diakonis VF, Matsou A, Tyradellis S. Optical Coherence Tomography Angiography in Neurodegenerative Diseases: A Review. *Eye Brain.* 2020;12:73-87.
63. Coscas F, Sellam A, Glacet-Bernard A, Jung C, Goudot M, Miere A, et al. Normative data for vascular density in superficial and deep capillary plexuses of healthy adults assessed by optical coherence tomography angiography. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(9):OCT211-223.

64. Wen C, Pei C, Xu X, Lei J. Influence of Axial Length on Parafoveal and Peripapillary Metrics from Swept Source Optical Coherence Tomography Angiography. *Curr Eye Res.* 2019;44(9):980-986.
65. Ucak T, Icel E, Yilmaz H, Karakurt Y, Tasli G, Ugurlu A, et al. Alterations in optical coherence tomography angiography findings in patients with high myopia. *Eye (Lond).* 2020;34(6):1129-1135.
66. Devarajan K, Sim R, Chua J, Wong CW, Matsumura S, Htoon HM, et al. Optical coherence tomography angiography for the assessment of choroidal vasculature in high myopia. *Br J Ophthalmol.* 2020;104(7):917-923.
67. Falavarjani KG, Shenazandi H, Naseri D, Anvari P, Kazemi P, Aghamohammadi F, et al. Foveal Avascular Zone and Vessel Density in Healthy Subjects: An Optical Coherence Tomography Angiography Study. *J Ophthalmic Vis Res.* 2018;13(3):260-265.
68. Alnawaiseh M, Brand C, Lauermann JL, Eter N. Messung der Flussdichte mittels OCT-Angiographie : Einfluss von Alter und Geschlecht [Flow density measurements using optical coherence tomography angiography : Impact of age and gender]. *Ophthalmologe.* 2018;115(8):659-662.
69. Borrelli E, Sacconi R, Querques L, Battista M, Bandello F, Querques G. Quantification of diabetic macular ischemia using novel three-dimensional optical coherence tomography angiography metrics. *J Biophotonics.* 2020;13(10).
70. Borrelli E, Grosso D, Parravano M, Costanzo E, Brambati M, Viganò C, et al. Volume rendered 3D OCTA assessment of macular ischemia in patients with type 1 diabetes and without diabetic retinopathy. *Sci Rep.* 2021;11(1):19793.
71. Bengtsson B, Krakau CE. Some essential optical features of the Zeiss fundus camera. *Acta Ophthalmol.* 1977;55(1):123-131.
72. Bengtsson B, Krakau CET. Correction of optic disc measurements on fundus photographs. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1992;30(1):24-28.
73. Littmann H. Zur Bestimmung der wahren Grösse eines Objektes auf dem Hintergrund des lebenden Auges [Determination of the real size of an object on the fundus of the living eye]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 1982;180(4):286-289.

74. Bennett AG, Rudnicka AR, Edgar DF. Improvements on Littmann's method of determining the size of retinal features by fundus photography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1994;232(6):361-367.
75. Garway-Heath DF, Rudnicka AR, Lowe T, Foster PJ, Fitzke FW, Hitchings RA. Measurement of optic disc size: equivalence of methods to correct for ocular magnification. *Br J Ophthalmol*. 1998;82(6):643-649.
76. Sampson DM, Gong P, An D, Menghini M, Hansen A, Mackey DA, et al. Axial length variation impacts on superficial retinal vessel density and foveal avascular zone area measurements using optical coherence tomography angiography. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(7):3065-3072.
77. Lei J, Durbin MK, Shi Y, Uji A, Balasubramanian S, Baghdasaryan E, et al. Repeatability and Reproducibility of Superficial Macular Retinal Vessel Density Measurements Using Optical Coherence Tomography Angiography En Face Images. *JAMA Ophthalmol*. 2017;135(10):1092-1098.
78. Lee JC, Grisafe DJ, Burkemper B, Chang BR, Zhou X, Chu Z, et al. Intra-session Repeatability and Inter-session Reproducibility of Peripapillary OCTA Vessel Parameters in Non-Glaucomatous and Glaucomatous Eyes. *Br J Ophthalmol*. 2021;105(11):1534-1541.
79. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab*. 2013;17(1):20-33.
80. Sun C, Ladores C, Hong J, Nguyen DQ, Chua J, Ting D, et al. Systemic hypertension associated retinal microvascular changes can be detected with optical coherence tomography angiography. *Sci Rep*. 2020;10(1):9580.
81. Carrera-Escalé L, Benali A, Rathert AC, Martín-Pinardel R, Bernal-Morales C, Alé-Chilet A, et al. Radiomics-Based Assessment of OCT Angiography Images for Diabetic Retinopathy Diagnosis. *Ophthalmol Sci*. 2023;3(2):100259.