Ricardo Holzchuh

**Estudo da reprodutibilidade do
exame de microscopia especular de córnea em
amostras com diferentes números de células**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Newton Kara-José

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Holzchuh, Ricardo

Estudo da reprodutibilidade do exame de microscopia especular de córnea em amostras com diferentes números de células / Ricardo Holzchuh. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oftalmologia.

Orientador: Newton Kara-José.

Descritores: 1.Microscopia/métodos 2.Endotélio da córnea 3.Análise de estatística
4.Contagem de células 5.Tamanho da amostra

USP/FM/DBD-192/11

DEDICATÓRIA

Aos meus pais queridos, **Nilo e Marlene**, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre me possibilitaram as oportunidades de realizar sonhos e conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a execução deste estudo ou que me acompanharam durante este período de formação, com compreensão e paciência, que permitiu o planejamento, a execução e conclusão desta Tese de Doutorado. Agradeço em especial:

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Newton Kara José**, Prof. Emérito da Disciplina de Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pessoa de grande humanismo, ensinou-me oftalmologia, pesquisa e que a busca do conhecimento deve ser contínua. Tornou-se orientador amigo do qual me orgulho de ter sido seu orientado.

Ao **Prof. Dr. Fernando Cesar Abib**, Prof. Adjunto do Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Paraná, exemplo de seriedade e competência. Amigo que com sua mente brilhante, é orgulho e motivação para os que prezam as atividades científicas. Responsável por me iniciar nas pesquisas endoteliais e sempre disponível, muito contribuiu na elaboração deste trabalho.

Aos meus grandes amigos **Dr. Richard Yudi Hida** e **Dra. Ilana Maeda Yamakami**, companheiros nos momentos difíceis, incentivadores e parceiros de novas idéias e projetos, que muito contribuíram na elaboração deste estudo. Muito obrigado pela paciência, carinho, amizade e auxílio técnico.

Ao **Prof. Dr. Milton Ruiz Alves**, Prof Livre Docente, Diretor do Setor de Córnea e Doenças Externas da Universidade de São Paulo, por todos seus conselhos e orientações, sempre com colocações adequadas nos momentos importantes.

A **Profa. Dra. Maria Cristina Nishiwaki Dantas**, Chefe do Ambulatório do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, amiga, modelo de inspiração. Agradeço os votos de confiança, incentivo e oportunidades que me foram dadas.

Ao **Prof. Dr. Remo Suzana Jr.**, Prof. Titular do Departamento de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, expoente da oftalmologia brasileira, pela oportunidade de terminar este projeto.

Ao **Prof. Dr. Mario Luiz Ribeiro Monteiro**, pela sua dedicação e compromisso com a coordenação da pós-graduação da área de Oftalmologia, sempre disposto a ajudar seus pós-graduandos.

Aos mestres **Profa. Dra. Maria Aparecida Onuki Haddad**, **Prfa. Dra. Tânia Mara Cunha Scharfer** e **Prof. Dr. Adamo Lui Netto** que, como membros da banca de qualificação, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões.

À **Profa. Dra. Ruth Miyuki Santo**, pelo auxílio, ensinamento, colaboração e amizade.

Ao **Dr. Wilmar Roberto Silvino**, pelas orientações e conselhos em estatística.

À **Regina Ferreira Almeida**, secretária da Pós-graduação do Departamento de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, por seu trabalho árduo, extremamente responsável e eficaz de ajudar a organizar a vida dos pós-graduandos do Departamento de Oftalmologia. Amiga, conselheira e protetora dos pós-graduandos. Muito obrigado.

À **Sandra Macedo, Cléia Borges Gomes Guarizo, Maria Cristina Ribeiro Silva e Edson José Arantes**, exemplos de dedicação, profissionalismo e competência nas tarefas de assessorar o Departamento de Oftalmologia.

Ao Departamento de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, que pelos Setores de Catarata, Lente de Contato e Superfície Ocular me receberam para mais uma etapa da minha formação e aos mestres da Clínica Oftalmológica, pelo ensinamento e dedicação.

Ao Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, que na pessoa do **Prof. Dr. Ralph Cohen** me recebeu em 2002 para que eu obtivesse minha base dos ensinamentos de oftalmologia e aos bons amigos que fiz.

Ao **Prof. Dr. José Ricardo Reggi**, Diretor do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela amizade, estímulo e apoio.

A todos os companheiros da Equipe do Setor de Córnea e Doenças Externas do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, em especial ao **Prof. Dr. Paulo Elias Correa Dantas** e **Prof. Dr. Sérgio Felberg**, pela paciente compreensão e colaboração durante as fases de realização desta tese.

Aos **colegas médicos, professores e funcionários do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo**, pela paciência, carinho e estímulo durante realização deste estudo.

A todos os companheiros da **Equipe do Setor de Superfície Ocular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, pela compreensão, carinho e auxílio durante as fases de realização desta Tese.

Ao meu querido primo **Dr. Flávio Galeta Holzchuh**, pelo carinho, paciência e colaboração em vários momentos desta jornada.

Ao corpo clínico, diretivo, administrativo e funcionários da Clínica de Olhos Holzchuh, pela dedicação e auxílio.

Prof. Dr. Nilo Holzchuh, Prof. Dr. Geraldo Vicente de Almeida, Dr. Luiz Amador Aguiar, Dr. Walter Dualibe, Dr. Wilmar Roberto Silvino, Profa. Dra. Paula Almeida, Dra. Erika Silvino, Dr. Flávio Dualibe e demais colegas e funcionários do Centro Oftalmológico Pacaembú, pela paciência, carinho e oportunidade de trabalhar com uma equipe vencedora.

A **todos os pacientes** que, com suas permissões viabilizaram a realização deste estudo.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de Apresentação de Dissertações, Teses e Monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e vocábulos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Anatomia da córnea	3
1.2	Endotélio	5
1.2.1	Histologia	5
1.2.2	Fisiologia.....	6
1.2.3	Regeneração endotelial	7
1.2.4	Alterações decorrentes da idade e raça	10
1.2.5	Semiologia endotelial	11
1.3	Microscopia especular de córnea	14
1.3.1	Princípio físico	15
1.3.2	Cronologia do desenvolvimento da microscopia especular de córnea	16
1.3.3	Classificação e modelos dos microscópios especulares	20
1.3.4	Programa para análise das imagens endoteliais	22
1.3.4.1	Histórico dos programas.....	23
1.3.4.2	Conceitos da morfologia das células endoteliais	25
1.3.4.3	Métodos de determinação da densidade celular.....	28
1.3.5	Análise crítica atual de microscopia especular de córnea.....	31
1.3.6	Programa para determinação do erro amostral e do tamanho da amostra endotelial.....	33
1.4	Relevância.....	37
1.5	Hipóteses	38
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo geral	40
2.2	Objetivos específicos.....	40

3	MÉTODOS	42
3.1	Tipo de estudo.....	43
3.2	Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa.....	43
3.3	População e amostra.....	43
3.3.1	Critérios de inclusão	43
3.3.2	Critérios de exclusão	44
3.3.3	Caracterização da amostra do estudo	45
3.3.4	Caracterização dos grupos do estudo	46
3.4	Microscopia especular de córnea	47
3.4.1	Microscópio especular de córnea	47
3.4.2	Captação das imagens endoteliais	48
3.4.3	Marcação das células endoteliais	48
3.4.4	Determinação das células consideradas para cálculo da semiologia endotelial	49
3.4.5	Informações endoteliais geradas pelo programa do microscópio especular	50
3.5	Programa Cells Analyzer PAT. REQ. para análise das amostras endoteliais	51
3.5.1	Poder estatístico amostral	52
3.5.2	Inserção dos resultados da análise das imagens endoteliais, gerados pelo microscópio especular de córnea, no programa Cells Analyzer PAT. REQ.	53
3.5.3	Interpretação do erro amostral na primeira imagem	54
3.5.4	Algoritmo da rotina do Cells Analyzer PAT. REQ. para ampliação da amostragem do endotélio	55
3.5.5	Dados amostrais calculados pelo Cells Analyzer PAT. REQ.	57
3.5.6	Dados endoteliais totalizados pelo Cells Analyzer PAT. REQ. para os grupos do estudo.....	58
3.6	Descritivo da metodologia de demonstração dos resultados dos exames endoteliais com respectivos dados amostrais	59
3.6.1	Valores de referência fornecidos pela população estudada	59
3.6.2	Avaliação do número de células utilizadas e desprezadas para o cálculo dos dados da semiologia endotelial	59
3.6.2.1	Tamanho das amostras calculadas e das amostras realizadas nos exames	60
3.6.2.2	Número de imagens necessárias para viabilizar o exame de microscopia especular	60
3.7	Erro Amostral nos grupos estudados	61
3.7.1	Exames considerados corretos	61
3.7.2	Comportamento do intervalo de confiança para os resultados do exame de microscopia especular	61

3.7.3	Demonstração, por meio gráfico, da amplitude dos intervalos de confiança para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais nos grupos estudados	62
3.7.4	Demonstração da diminuição do intervalo de confiança por meio de porcentagem para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais nos grupos estudados	62
4	RESULTADOS.....	63
4.1	Valores de referência para a população estudada	64
4.2	Dados relativos ao comportamento dos intervalos de confiança	71
4.3	Demonstração do comportamento da amplitude dos intervalos de confiança	79
5	DISCUSSÃO	84
6	CONCLUSÕES	111
6.1	Conclusões gerais	112
6.2	Conclusões específicas	112
7	ANEXOS.....	114
	Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética para o projeto de pesquisa e termo de consentimento desta tese.....	115
	Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CAPPesq).....	116
8	REFERÊNCIAS.....	119

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E VOCÁBULOS

ACA	average cell area
ACM	área celular média
AMB	ambulatório
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
CA	Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC	número de células consideradas
CD	cell density
cm	centímetro
cel/mm ²	célula por milímetro quadrado
CV	coeficiente de variação
DE	densidade endotelial
Diam.	diâmetro
DP	desvio-padrão
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
h	hora
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEX	porcentagem de células hexagonais
IC	intervalo de confiança
K ⁺	potássio
Kg	quilograma
L	litro
Laser	Light Amplified by Stymulated Emission of Radiation

MEC	microscopia especular de córnea
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MET	microscopia eletrônica de transmissão
μm	micrômetro
μm^2	micrômetro quadrado
mm	milímetro
mm^2	milímetro quadrado
MO	microscopia óptica
mOsm/l	miliosmol por litro
n	número
Na^+	sódio
OD	olho direito
OE	olho esquerdo
p	probabilidade
X	vezes
μ	mícron
%	porcentagem
<	menor que
>	maior que
=	igual
&	e

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Número de imagens necessárias para realizar exame de
	microscopia especular, amostralmente correto -
	HCFMUSP - 2008.....
	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mosaico endotelial e membrana de Descemet da córnea humana sadia mostrados pela Microscopia eletrônica de varredura. Aumento de 640 X	2
Figura 2 -	Desenho esquemático de corte sagital do globo ocular que evidencia a córnea	3
Figura 3 -	Corte histológico corado com azul de toluidina demonstrando as camadas da córnea humana. Aumento de 100 X	4
Figura 4 -	(A) Representação gráfica da reflexão especular do raio luminoso incidente sobre a superfície endotelial; (B) Imagem de microscopia especular do endotélio normal.....	16
Figura 5 -	(A) Microscópio especular de córnea de contato; (B) Microscópio especular de córnea de não contato	22
Figura 6 -	Desenho esquemático do método de análise do retículo fixo: Somente as células dentro do retângulo são consideradas	28
Figura 7 -	Avaliação da densidade endotelial de córnea pelo método de marcação dos centros celulares, realizado pelo programa <i>Bambi 2000 Plus</i> . Células marcadas em vermelho e circundadas de amarelo foram consideradas para cálculos da morfologia endotelial, as células marcadas em lilás foram desconsideradas	29
Figura 8 -	Desenho esquemático do método de análise do retículo móvel: As bordas de um grupo de células são circundadas	30
Figura 9 -	Microscópio especular de não contato Konan®, modelo Noncon Robo SP-8000.....	47

Figura 10 -	Tela do resultado do exame no microscópio especular de não contato Konan®, modelo Noncon Robo SP-8000, no qual foram marcadas 150 células e o aparelho considerou 109 células (destacado em vermelho)	50
Figura 11 -	Tela de abertura do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> com seu índice	51
Figura 12 -	Tela do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> que demonstra: (A) inserção dos dados de identificação do paciente; (B) escolha do grau de confiança.....	52
Figura 13 -	Tela do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> que demonstra a inserção dos dados semiológicos da imagem endotelial avaliada pela microscopia especular de córnea	53
Figura 14 -	Tela do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> que demonstra a análise dos dados endoteliais da primeira imagem. Seta em vermelho mostra o erro relativo calculado maior que o erro relativo planejado	54
Figura 15 -	Fluxograma demonstrativo da rotina operacional do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> com as informações necessárias para realização de seus cálculos e sistemática de análise dos resultados calculados	56
Figura 16 -	Tela do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> que demonstra os dados endoteliais do exame composto de quatro imagens endoteliais e respectiva análise estatística	58

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Valores de referência encontrados na população do estudo para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais na população estudada – HCFMUSP - 200864
- Quadro 2** – Valores de referência calculados para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais - HCFMUSP - 200865
- Quadro 3** - Percentual de células endoteliais marcadas, consideradas e desconsideradas no exame de microscopia especular com 40, 100 e 150 células, numa única imagem do mosaico endotelial - HCFMUSP - 2008.....66
- Quadro 4** – Média do número de células calculado pelo Cells Analyzer PAT. REQ. e média do número de células efetivamente incluídas no processo amostral - HCFMUSP - 2008.....67
- Quadro 5** - Erro amostral dos exames de microscopia especular ao serem marcadas 40, 100 e 150 células, numa única imagem do mosaico endotelial e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ. - HCFMUSP - 2008.....69
- Quadro 6** - Percentual de exames corretos e de exames com amostragem insuficiente ao serem marcadas 40, 100 e 150 células em uma única imagem do mosaico endotelial e tantas quanto indicado pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(CA) - HCFMUSP - 2008.....70
- Quadro 7** – Olho direito: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da densidade endotelial, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008.....80

Quadro 8 – Olho esquerdo: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da densidade endotelial, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008.....	80
Quadro 9 – Olho direito: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da área celular média, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008.....	81
Quadro 10 - Olho esquerdo: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da área celular média, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008.....	81
Quadro 11 - Olho direito: Demonstração dos limites do intervalo de confiança do coeficiente de variação, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008.....	82
Quadro 12 - Olho esquerdo: Demonstração dos limites do intervalo de confiança do coeficiente de variação, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude em comparações realizadas sempre com o grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008.....	82
Quadro 13 - Olho direito: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da porcentagem de células hexagonais, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude em comparações realizadas sempre com o grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008.....	83

Quadro 14 - Olho esquerdo: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da porcentagem de células hexagonais, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008.....83

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Percentual de células endoteliais marcadas e desconsideradas no exame de microscopia especular com 40, 100 e 150 células, numa única imagem do mosaico endotelial - HCFMUSP - 2008.....66
- Gráfico 2** – Olho direito: Efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da densidade endotelial da córnea, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total) - HCFMUSP - 200871
- Gráfico 3** – Olho esquerdo: Efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da densidade endotelial da córnea, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total) - HCFMUSP - 200872
- Gráfico 4** – Olho direito: Efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da área celular média (ACM), demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ. (Total) - HCFMUSP - 200873
- Gráfico 5** – Olho esquerdo: Efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da área celular média (ACM), demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total) - HCFMUSP - 2008.....74

Gráfico 6 – Olho direito: Efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado do coeficiente de variação, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> (Total) - HCFMUSP - 2008	75
Gráfico 7 – Olho esquerdo: Efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado do coeficiente de variação, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> (Total). - HCFMUSP - 2008.....	76
Gráfico 8 – Olho direito: Efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da porcentagem de células hexagonais, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> (Total) - HCFMUSP - 2008	77
Gráfico 9 – Olho esquerdo: Efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da porcentagem de células hexagonais, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer <small>PAT. REQ.</small> (Total) - HCFMUSP - 2008	78

RESUMO

Holzchuh R. *Estudo da reprodutibilidade do exame de microscopia especular de córnea em amostras com diferentes números de células* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 137 p.

INTRODUÇÃO: O endotélio corneal exerce papel primordial para a fisiologia da córnea. Seus dados morfológicos gerados pelo microscópio especular (MEC) como densidade endotelial (DE), área celular média (ACM), coeficiente de variação (CV) e porcentagem de células hexagonais (HEX) são importantes para avaliar sua vitalidade. Para interpretar estes dados de forma padronizada e reprodutível, foi utilizado um programa estatístico de análise amostral, Cells Analyzer PAT. REQ.(CA). **OBJETIVO:** Demonstrar valores de referência para DE, ACM, CV e HEX. Demonstrar o percentual de células endoteliais marcadas e desconsideradas no exame ao marcar-se 40, 100 e 150 células em uma única imagem do mosaico endotelial e o perfil do intervalo de confiança (IC) das variáveis estudadas ao se considerar 40, 100, 150 e tantas células quantas indicadas pelo CA. Demonstrar o erro amostral de cada grupo estudado. **MÉTODOS:** Estudo transversal. Os exames de MEC foram realizados com o aparelho Konan NONCON ROBO® SP-8000, nos 122 olhos de 61 portadores de catarata ($63,97 \pm 8,15$ anos de idade). As imagens endoteliais caracterizaram-se pelo número de células marcadas e consideradas para cálculo dos seguintes dados: DE, ACM, CV e HEX. Os grupos foram formados de 40, 100, 150 células marcadas numa única imagem endotelial e Grupo CA em que foram marcadas tantas células quanto necessárias em diferentes imagens, para obter o erro relativo calculado inferior ao planejado (0,05), conforme orientação do programa CA. Estudou-se o efeito do número de células sobre IC para as variáveis endoteliais utilizadas. **RESULTADOS:** A média dos valores de referência encontrados para DE foi $2395,37 \pm 294,34$ cel/mm²; ACM $423,64 \pm 51,09$ μm²; CV $0,40 \pm 0,04$ e HEX $54,77 \pm 4,19\%$. O percentual de células endoteliais desconsideradas no Grupo 40 foi 51,20%; no Grupo 100, 35,07% e no Grupo 150, 29,83%. O número médio de células calculado inicialmente pelo CA foi $247,48 \pm 51,61$ e o número médio de células efetivamente incluídas no final do processo amostral foi $425,25 \pm 102,24$. O erro amostral dos exames no Grupo 40 foi $0,157 \pm 0,031$; Grupo 100, $0,093 \pm 0,024$; Grupo 150, $0,075 \pm 0,010$ e Grupo CA, $0,037 \pm 0,005$. O aumento do número de células diminuiu a amplitude do IC nos olhos direito e esquerdo para a DE em 75,79% e 77,39%; ACM em 75,95% e 77,37%; CV em 72,72% e 76,92%;

HEX em 75,93% e 76,71%. **CONCLUSÃO:** Os valores de referência da DE foi $2395,37 \pm 294,34$ cel/mm²; ACM foi $423,64 \pm 51,09$ μm²; CV foi $0,40 \pm 0,04$ e HEX foi $54,77 \pm 4,19\%$. O percentual de células endoteliais desconsideradas no Grupo 40 foi 51,20%; no Grupo 100 foi 35,07% e no Grupo 150 foi 29,83%. O programa CA considerou correto os exames nos quais $425,25 \pm 102,24$ células foram marcadas entre duas e cinco imagens (erro relativo calculado de $0,037 \pm 0,005$). O aumento do número de células diminuiu a amplitude do IC para todas as variáveis endoteliais avaliadas pela MEC.

Descritores: Microscopia especular de córnea, análise estatística, Cells Analyzer, endotélio da córnea, erro amostral, densidade endotelial.

SUMMARY

Holzchuh R. *Reproducibility study of the corneal specular microscope in samples with different number of cells* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 137 p.

INTRODUCTION: Corneal endothelium plays an important role in physiology of the cornea. Morphological data generated from specular microscope such as endothelial cell density (CD), average cell area (ACA), coefficient of variance (CV) and percentage of hexagonal cells (HEX) are important to analyze corneal status. For a standard and reproducible analysis of the morphological data, a sampling statistical software called Cells Analyzer ^{PAT.} _{REC} (CA) was used. **PURPOSE:** To determine normal reference values of CD, ACA, CV and HEX. To analyze the percentage of marked and excluded cells when the examiner counted 40, 100, 150 cells in one endothelial image. To analyze the percentage of marked and excluded cells according to the statistical software. To determine the confidence interval of these morphological data. **METHODS:** Transversal study of 122 endothelial specular microscope image (Konan, non-contact NONCON ROBO® SP-8000 Specular Microscope) of 61 human individuals with cataract (63.97 ± 8.15 years old) was analyzed statistically using CA. Each image was submitted to standard cell counting. 40 cells were counted in study Group 40; 100 cells were counted in study Group 100; and 150 cells were counted in study Group 150. In study group CA, the number of counted cells was determined by the statistical analysis software in order to achieve the most reliable clinical information (relative error $< 0,05$). Relative error of the morphological data generated by the specular microscope were then analyzed by statistical analysis using CA software. For Group CA, relative planned error was set as 0.05. **RESULTS:** The average normal reference value of CD was 2395.37 ± 294.34 cells/mm², ACA was 423.64 ± 51.09 μm², CV was 0.40 ± 0.04 and HEX was $54.77 \pm 4.19\%$. The percentage of cells excluded for analysis was 51.20% in Group 40; 35.07% in Group 100; and 29.83% in Group 150. The average number of cells calculated initially by the statistical software was 247.48 ± 51.61 cells and the average number of cells included in the final sampling process was 425.25 ± 102.24 cells. The average relative error was 0.157 ± 0.031 for Group 40; 0.093 ± 0.024 for Group 100; 0.075 ± 0.010 for Group 150 and 0.037 ± 0.005 for Group CA. The increase of the marked cells decreases the amplitude of confidence interval (right and left eyes respectively) in 75.79% and 77.39% for CD; 75.95% and 77.37% for ACA; 72.72% and 76.92% for CV; 75.93% and

76.71% for HEX. **CONCLUSION:** The average normal reference value of CD was 2395.37 ± 294.34 cells/mm², ACA was 423.64 ± 51.09 μm², CV was 0.40 ± 0.04 and HEX was $54.77 \pm 4.19\%$. The percentage of excluded cells for analysis was 51.20% in Group 40; 35.07% in Group 100 and 29.83% in Group 150. CA software has considered reliable data when 425.25 ± 102.24 cells were marked by the examiner in two to five specular images (calculated relative error of 0.037 ± 0.005). The increase of the marked cells decreases the amplitude of confidence interval for all morphological data generated by the specular microscope.

Descriptors: corneal specular microscope, statistical analysis, Cells Analyzer, endothelium, sampling error, endothelial cell density.

1 INTRODUÇÃO

O endotélio corneal, monocamada de células hexagonais, é objeto de estudo na prática oftalmológica, pois seu papel é primordial para fisiologia e transparência da córnea ¹⁻⁵. Seus dados morfológicos como densidade endotelial, coeficiente de variação, área celular média e porcentagem de células hexagonais são importantes ferramentas para avaliar a saúde fisiológica da córnea ^{3, 5-9}. Estes dados morfológicos podem sofrer alterações em seus parâmetros após as doenças da córnea, procedimentos cirúrgicos e envelhecimento quando comparados com o que é considerado normal ^{6, 10-15}.

Atualmente, com o desenvolvimento de novas técnicas e com o aumento dos procedimentos cirúrgicos intraoculares, torna-se necessário estudo padronizado e reprodutível do mosaico endotelial (Figura 1) pelo microscópio especular de córnea ^{13, 14, 16-21}.

Fonte: Guimarães MR. Fisiologia do Endotélio Corneano. In Abib FC. *Microscopia Especular de Córnea – Manual e Atlas*. Rio de Janeiro: Rio Med; 2000. p. 7-17.

Figura 1 – Mosaico endotelial e membrana de Descemet da córnea humana sadia mostrados pela Microscopia eletrônica de varredura. Aumento de 640 X

1.1 Anatomia da córnea

A córnea é um tecido transparente e avascular que com a esclera forma o revestimento externo do bulbo ocular e ocupa um terço da túnica ocular. A superfície anterior da córnea é coberta pelo filme lacrimal e sua face posterior é embebida diretamente pelo humor aquoso^{3, 5} (Figura 2).

Fonte: ADAM Images, EUA, 2010.

Figura 2 - Desenho esquemático de corte sagital do bulbo ocular que evidencia a córnea

A córnea humana adulta mede cerca de 11 a 12 mm na horizontal e 9 a 11 mm na vertical. Tem aproximadamente 500 μm de espessura em sua porção central, que gradativamente aumenta em direção à periferia, onde apresenta cerca de 700 μm de espessura^{2, 3}.

A curvatura da superfície corneal não é constante, sendo maior no centro e menor na periferia. Os três milímetros centrais da córnea são denominados de zona óptica e seu raio de curvatura varia de 7,5 a 8,0 mm. Seu poder refrativo é de 40,00 a 44,00 dioptrias, que constitui cerca de dois terços do poder refrativo total do olho ^{3, 4}.

Krachmer et al. (2005) afirmaram que a córnea humana é composta de 5 camadas: epitélio com sua membrana basal, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio ^{2, 3} (Figura 3).

Fonte: Santo RM, 2010.

Figura 3 - Corte histológico corado com azul de toluidina, demonstrando as camadas da córnea humana. Aumento de 100 X

1.2 Endotélio

1.2.1 Histologia

O endotélio da córnea é estruturado em uma única camada de células, cujas superfícies anterior e posterior apresentam-se como um mosaico regular de células poligonais, hexagonais em sua maioria, que revestem a face posterior da córnea. É banhado posteriormente pelo humor aquoso, estando na face anterior em íntimo contato com a membrana de Descemet. Lateralmente, continua como endotélio do trabeculado escleral^{2-4, 6}.

Kreutziger (1976) estudou a morfologia e a relação das membranas plasmáticas das células endoteliais da córnea de coelhos, por meio da adição de lantânio nas preparações submetidas à microscopia eletrônica de transmissão (MET). Constatou presença de interdigitações extensas entre as células endoteliais e a ocorrência de vários complexos juncionais, o que aumenta a superfície de contato entre elas²².

O endotélio tem população de 400 a 500 mil células, cada uma com medida de 18 a 20 μm de largura, por 4 a 6 μm de espessura. O núcleo mede 7 μm de diâmetro. Nos humanos, a área estimada da superfície do endotélio corneal é, aproximadamente, de 130 mm^2 ^{3, 23-25}.

1.2.2 Fisiologia

O endotélio exerce funções de barreira à entrada de fluidos, dificultando a hidratação da córnea e de bomba ativa para transporte de íons e água para câmara anterior. Este mecanismo é fundamental para a transparência da córnea, ou seja, previne o edema corneal que pode levar a baixa da acuidade visual^{3, 26}.

Edelhauser et al. (1981) perfundiram o endotélio com solução salina balanceada de diferentes osmolaridades. Notaram que com a perfusão hiposmótica houve aumento da espessura corneal; o contrário ocorreu com solução hiperosmótica. No entanto, a estrutura celular observada, à microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia especular de córnea (MEC), não sofreu alterações. A espessura da córnea voltou ao normal, quando foi usada uma solução de perfusão com 300 mOsm/l. Os autores concluíram que o endotélio corneal pode tolerar soluções com osmolaridade de 200 a 400 mOsm/l sem ruptura celular, desde que os íons essenciais estejam presentes na solução a ser utilizada²⁷.

Waring III et al. (1982), abordando a fisiologia da córnea, relataram que ela apresenta importante função de manter a transparência e espessura corneal por dois mecanismos: barreira e bomba endotelial. A barreira endotelial diminui a hidratação da córnea pela resultante do somatório de todos os complexos juncionais (*tight* e *gap junctions*) e a bomba endotelial pelo transporte ativo de íons, decorrentes da atividade das enzimas Na^+/K^+ -

ATPase e da anidrase carbônica, do endotélio para a câmara anterior, culminando com o retorno da água ²⁸.

Mishima (1982) afirmou que lesão significativa das células endoteliais (número de células abaixo do limiar de 400 a 700 cel/mm²) por causas inflamatórias ou na decorrência de trauma cirúrgico (cirurgia intraocular de catarata e glaucoma), leva à falência endotelial e consequente edema da córnea, com perda localizada de sua transparência, que pode evoluir para descompensação e falência da córnea permanente, com importante comprometimento da acuidade visual ^{29, 30}.

1.2.3 Regeneração endotelial

Células endoteliais da córnea não proliferam em humanos, macacos e gatos, mas elas podem dividir-se nos coelhos. Células endoteliais da córnea humana podem se proliferar nas culturas celulares, portanto, demonstram habilidade de realizarem mitose. Fatores no humor aquoso e outros componentes no meio em que as células endoteliais se encontram podem ser responsáveis pela inibição da mitose *in situ* ³.

Binder e Binder (1957) estudaram por meio de microscopia óptica, a regeneração do endotélio corneal de coelhos sob condições normais e durante a cicatrização, após trauma mecânico com espátula romba. Nos endotélios examinados, verificaram evidências da divisão celular amitótica ³¹.

Capella (1972) comparou regeneração endotelial humana com a de coelhos e macacos, após trauma, pela microscopia eletrônica. Concluiu que o processo de regeneração celular no homem ocorre de forma semelhante a dos animais, pelo repovoamento celular da área desnuda por meio dos mecanismos, como diferenciação retrógrada, expansão e possível divisão celular. No entanto, certas doenças oculares humanas, como nas ceratopatas bolhosas, tais mecanismos de regeneração não atuaram de maneira adequada, resultando no surgimento de uma camada de células multinucleadas ³².

Van Horn et al. (1977), após destruição de 10%, 50% e 90% do endotélio corneal central de coelhos e gatos, estudaram a regeneração endotelial pela paquimetria, microscopia eletrônica e análise autorradiográfica. Observaram que a regeneração endotelial no coelho ocorreu em 10 dias por mitose celular, em contraste com o pequeno número de divisões celulares encontrado nas células endoteliais do gato, que promoveram regeneração celular pelo processo de alargamento e migração de células. Concluíram que a regeneração endotelial na córnea do gato apresenta padrão semelhante à da córnea humana ³³.

Laing et al. (1983) estudaram pela microscopia especular, córneas humanas e traumatizadas. Encontraram células grandes, de formato irregular e multinucleado, que supõem tratar-se de coalescência de células ³⁴.

Yee et al. (1985) estudaram a recuperação da função de bomba do endotélio corneal de coelhos após lesão por congelamento. Avaliaram o

tecido por meio de vários métodos: paquimetria óptica, ligação com ouabaína tritiada (avalia função de bomba do endotélio), montagem em câmaras de perfusão (avalia função endotelial de barreira), coloração com vermelho de alizarina e azul de tripan, microscopia especular de campo amplo com morfometria assistida por computador e microscopia eletrônica de varredura. Concluíram que a recuperação funcional do endotélio lesado precede sua reorganização morfológica e este processo pode ser dividido em três estádios: estágio I com cobertura inicial da área lesada por células pleomórficas e fusiformes, formando barreira funcional incompleta e com mínima capacidade de bombeamento; estágio II com células que assumem aspecto mais achatado, formando polígonos irregulares, com capacidade quase normal de bombeamento e estágio III com remodelamento da camada celular, que retoma seu aspecto usual de mosaico ³⁵.

Matsuda et al. (1985) pesquisaram a cicatrização do endotélio corneal de coelhos *in vivo* após trauma mecânico com fio de seda 4-0, por meio de microscopia especular de grande campo associada à morfometria celular assistida por computador. A região traumatizada foi acompanhada por exames seriados (0, 3, 12, 24, 48, 72 e 120 horas após a lesão) e um coelho foi utilizado como modelo de comportamento das células no processo de cicatrização. Concluíram que as células próximas à lesão tendem à migração para o local da mesma, com evidente modificação de sua morfologia no período entre 3 e 12 horas de trauma. No período entre 24 e 48 horas pós-trauma, a superfície lesada está completamente recoberta de células grandes e irregulares ⁸.

1.2.4 Alterações decorrentes da idade e raça

Com o estudo da biologia endotelial, sabe-se que a densidade das células endoteliais diminui com aumento da idade. A perda celular é mais intensa nos primeiros anos de vida. Parte desse decréscimo, deve-se ao aumento do bulbo ocular nos primeiros 3 a 5 anos de vida. Após essa idade, a densidade endotelial diminui gradativamente a uma taxa estimada de 0,5% de células ao ano ^{10-12, 15}.

Bourne e Kaufman (1976) estudaram endotélio corneal central de 40 indivíduos de 6 a 80 anos pela microscopia especular de córnea e encontraram decréscimo significativo do número de células com a idade ³⁶.

Após avaliação da densidade endotelial nas várias faixas etárias, Laule et al. (1978) relataram que esta apresenta decréscimo gradativo desde o nascimento até a morte, surgindo áreas endoteliais com aparência de ausência de células na região central em 12% dos indivíduos na terceira década de vida e 67% nos indivíduos na nona década de vida ³⁷.

Waring III et al. (1982) relataram que com o aumento da idade ocorre perda celular que não consegue ser suprida com a divisão das células remanescentes, para restabelecer a barreira funcional, elas se alargam de forma desigual, causando irregularidade do tamanho (polimegetismo) e da forma (pleomorfismo) ²⁸.

Alguns estudos mostraram mudanças no perfil do endotélio corneal com relação à raça. Matsuda et al. (1985) compararam a morfologia do endotélio da córnea entre populações americanas e japonesas e

evidenciaram aumento significativo da densidade endotelial na população japonesa em relação à população americana de mesma faixa etária. Entretanto, não evidenciaram diferença entre coeficiente de variação, área celular média e porcentagem de células hexagonais nas duas populações ³⁸.

1.2.5 Semiologia endotelial

Na clínica oftalmológica, a avaliação e o estudo do endotélio corneal são realizados pela biomicroscopia na lâmpada de fenda, paquimetria e microscopia especular. Em 1920, Vogt relatou, pela primeira vez, a observação do mosaico endotelial pela biomicroscopia ³⁹. Tal observação é possível, realizando-se a microscopia especular pela técnica de iluminação direta focal na lâmpada de fenda com grande magnificação. Na prática clínica, esse exame é limitado, pois a magnificação insuficiente e o movimento do olho examinado comprometem a avaliação e a quantificação adequada das células endoteliais ^{2, 3}.

A medida de espessura da córnea pela paquimetria mostra de modo indireto a função endotelial, porque esta reflete o estado de sua deturgescência. A média da espessura central da córnea é de, aproximadamente, 500 μm e aumenta gradativamente em direção à periferia, ao redor de 700 μm . No entanto, a paquimetria pode variar, de acordo com o momento do dia. Paciente com córnea sadia, ao acordar, pode apresentar espessura da córnea levemente maior do que ao longo do dia. Isto ocorre porque ao fechar a pálpebra, há perda do efeito de evaporação,

bem como redução da atividade metabólica endotelial. O edema noturno é exacerbado, quando se tem disfunção endotelial, provocando visão turva pela manhã que melhora ao longo do dia ^{2, 40-45}.

Mishima (1982) avaliou a função e a morfologia do mosaico endotelial por três técnicas: paquimetria, microscopia especular e fluorofotometria corneal. A paquimetria avalia a espessura da córnea e indiretamente a função endotelial; a microscopia especular avalia a morfologia e, conseqüentemente, a função do mosaico, e a fluorofotometria permite a avaliação direta do estado funcional da barreira endotelial ^{29, 30}.

Jurkunas e Colby (2005) relataram que as principais técnicas e instrumentos para avaliação clínica do endotélio corneal são: biomicroscopia com lâmpada de fenda, microscopia especular, microscopia confocal, paquimetria e fluorofotometria. Após avaliação das vantagens e desvantagens de cada técnica, concluíram que cada uma delas tem sua indicação e modalidade clínica na prática oftalmológica diária ⁴⁶.

Abib e Barreto (2001) introduziram o conceito de monitoramento biológico aplicado ao endotélio da córnea, fundamentado na medicina ocupacional, como sendo o acompanhamento da variável da biologia do corpo humano (mosaico endotelial) capaz de indicar alterações da fisiologia de determinado órgão ou tecido (córnea), conseqüente à exposição de determinado agente (lentes de contato, procedimentos cirúrgicos intraoculares com ou sem implantes intraoculares, dentre outros). Uma vez que o mosaico endotelial e suas células podem ser monitorados com confiabilidade e reprodutibilidade, o monitoramento biológico do endotélio da

córnea torna-se uma necessidade, pois a córnea é uma estrutura anatômica com características de lente biológica, transparente, sendo esta característica mantida pela função de suas células endoteliais ¹⁰.

McCarey (1979) e Abib (2005) discorreram sobre semiologia do mosaico e da célula endotelial pela microscopia especular de córnea. A semiologia do mosaico endotelial avalia a densidade celular, com o objetivo de estimar quantitativamente o número de células existentes em cada um dos milímetros quadrados de área examinada neste mosaico, além de avaliar estruturas anexas, tais como células inflamatórias, depósitos endoteliais, dobras da membrana de Descemet, vesículas, entre outros ^{7, 19}.

Na avaliação semiológica da célula endotelial, estuda-se:

- 1 - Tamanho celular endotelial médio ou área celular média (ACM) que representa o tamanho médio de uma determinada população de células estudada. Sua unidade de área é o μm^2 ;
- 2 - Coeficiente de variação (CV): população de células endoteliais apresenta determinado padrão de dispersão de tamanho em torno de uma média. Esta dispersão é chamada de polimegetismo e também é indicativa de diminuição da reserva funcional dessas células, ou mesmo, estresse ou sofrimento. O dado semiológico que avalia polimegetismo é o coeficiente de variação, que é dado pelo desvio padrão do tamanho celular médio, dividido pelo tamanho celular médio, podendo ser expresso em decimais ou percentuais;
- 3 - Porcentagem de células hexagonais (HEX): a morfologia da célula endotelial normal é predominantemente hexagonal, pequena parte da

população destas células pode ter seu número de lados diferentes, sendo maiores ou menores que seis lados. A variação do número de lados é denominada de pleomorfismo, sendo indicativa da diminuição da reserva funcional destas células, ou mesmo, estresse ou sofrimento. Este aspecto morfológico celular é avaliado pela porcentagem de células com menos de seis lados, seis lados e mais de seis lados ^{5-7, 19}.

1.3 Microscopia especular de córnea

Maurice (1968) introduziu a técnica de microscopia especular. A partir daí, outros microscópios especulares de contato e não contato foram desenvolvidos para estudo do endotélio corneal *in vivo* ²⁶. Com o desenvolvimento de novos estudos, as técnicas de exames aperfeiçoaram-se, tornaram-se mais automatizadas, com melhor qualidade de imagem e métodos de análise endotelial. Programas de computador sofisticados foram desenvolvidos para determinar os limites celulares, diretamente de uma imagem ou vídeo original ^{47, 48}.

O desenvolvimento dessa técnica propiciou a avaliação da variação da vitalidade endotelial com a idade, após cirurgias intraoculares, nos usuários de lentes de contato, promovendo grande avanço no estudo morfológico do endotélio ^{26, 47, 48}.

O trauma cirúrgico intraocular determina perda de células endoteliais da córnea, a cirurgia de catarata representa o exemplo mais clássico desta

perda celular. A análise da densidade celular do endotélio corneal, pela microscopia especular, é utilizada na maioria dos estudos que avaliam a segurança de novas técnicas cirúrgicas intraoculares ou substâncias a serem empregadas nesses procedimentos^{18, 49-52}.

1.3.1 Princípio Físico

A microscopia especular é uma técnica não invasiva, de fácil realização, baseada na reflexão de um feixe luminoso incidente sobre a superfície do endotélio corneal, na qual uma parte reflete de forma especular, e é captada pelo microscópio especular, que apresenta imagem endotelial magnificada por um conjunto eletrônico (Figura 4)^{5, 6, 19, 20}.

Phillips et al. (2005) discutiram sobre o princípio físico da microscopia especular de córnea. Quando o feixe luminoso incide sobre uma superfície, ocorrem três efeitos: reflexão, transmissão e absorção. O mais importante na microscopia especular é a reflexão deste, que se dá quando o ângulo de recepção é igual ao de incidência. Dessa forma, parte do feixe luminoso incidente sobre o endotélio reflete de forma especular, sendo capturado pelo aparelho de microscopia especular de córnea, formando a imagem. Na córnea normal, a maioria do feixe luminoso é transmitida pela córnea⁵.

Fonte: (A) Phillips et al., Philadelphia, 2004; (B) foto do autor, São Paulo, 2008.

Figura 4 - (A) Representação gráfica da reflexão especular do raio luminoso incidente sobre a superfície endotelial; (B) Imagem de microscopia especular do endotélio normal

1.3.2 Cronologia do desenvolvimento da microscopia especular de córnea

Maurice (1968) proporcionou grande avanço na pesquisa envolvendo o endotélio corneal, pois foi quem primeiro descreveu a microscopia especular, que se baseia na reflexão do feixe luminoso incidente sobre a superfície regular do endotélio da córnea, cuja parte reflete de forma

especular, permitindo a observação *in vivo* das células endoteliais, sem lhes causar lesão ²⁶.

Laing et al. (1975) aperfeiçoaram o microscópio descrito por Maurice, permitindo execução de exames *in vivo* e registro fotográfico dos achados ²³.

Bourne e Kaufman (1976) introduziram melhoria na técnica da microscopia especular *in vivo*, permitindo melhor resolução das imagens obtidas, fotografia do tecido e contagem celular. Atestaram a simplicidade do exame em humanos e sua relativa inocuidade ³⁶.

Laing et al. (1979) avaliaram o endotélio corneal central pela microscopia especular, descrevendo o padrão morfométrico normal do endotélio, como uma camada de células contíguas, com bordas bem definidas ¹³.

Neubauer et al. (1984) estudaram a viabilidade endotelial de córneas armazenadas a temperatura de 4°C nos diferentes tipos de conservação (câmara úmida, meio de McCarey-Kaufman e meio de cultura de tecido TC-199). Utilizaram modificação da técnica de microscopia especular usada por Bourne, na qual os autores fizeram a análise corneal pela sua face endotelial e o azul de Tripan, como corante vital. Os autores relataram melhor condição de avaliação das córneas doadoras com a técnica modificada, com imersão da lente do microscópio especular de contato na água, trabalhando a distância de nove milímetros ⁵³.

Lohman et al. (1981) realizaram estudo com microscopia especular de contato com imersão da lente objetiva no fluoreto de magnésio, que resultou no decréscimo do índice de refração e promoveu contato estável com a

córnea, obtendo assim visão ampla do endotélio, permitindo com a mudança do foco a avaliação de outras camadas da córnea ⁵⁴.

Yee et al. (1985) estudaram o endotélio corneal de coelhos pela microscopia especular, comparando os achados entre si. Calcularam a densidade endotelial, índices de polimegatismo e pleomorfismo. Concluíram que seus achados sugeriam uma correlação entre a morfologia do endotélio, a filogenia dos vertebrados e sua capacidade funcional ³⁵.

Yee et al. (1985) desenvolveram um método para obtenção da densidade celular e coeficiente de variação, por comparação com painéis predeterminados de delineamento celular ²⁴.

Geroski e Edelhauser (1989) realizaram estudo morfométrico do endotélio corneal, comparando os métodos de microscopia especular de grande campo com coloração vermelha de Alizarina ⁵⁵.

Doughty (1992) estudou o formato celular do endotélio da córnea de coelhos, considerando a simetria dos lados das células, ou seja, quão mais hexagonal seria sua forma. Por meio de digitalização de micrografias produzidas por outros autores, assinalou que os indicadores empregados na análise da simetria das células deveriam ser adequados para levar em consideração a regularidade da parede celular e não necessariamente sua semelhança com um hexágono perfeito. Esta outra forma de medida levaria em conta apenas a medida da área celular e seu perímetro, agrupando as células, de acordo com seu tipo e fornecendo área celular média para cada grupo, com desvio-padrão e medida da assimetria da distribuição (*skewness coefficient*). Assim sendo, o coeficiente de variação seria um indicador de

valor duvidoso, especialmente, para relatar mudanças nas células endoteliais ⁵⁶.

Dick et al. (1996) realizaram estudo da perda celular do endotélio corneal central de 58 pacientes submetidos à facoemulsificação, com implante de lente intraocular em incisões de 3,5 e 5,5 mm e encontraram perda celular significativamente menor nos pacientes com incisões de 3,5 mm ⁵⁷.

Larsson et al. (1996) estudaram o endotélio corneal pela microscopia especular de contato e avaliação da permeabilidade e autofluorescência do endotélio, nos indivíduos portadores de Diabetes mellitus tipos I e II, comparando-os entre si e com indivíduos saudáveis. Encontraram aumento do pleomorfismo, polimegetismo e autofluorescência do endotélio nos indivíduos portadores de Diabetes mellitus tipo I, em relação ao grupo controle ⁵⁸.

Alves (2001) estudou o efeito da lidocaína a 1% sem preservante sobre o endotélio corneal de coelhos, pela microscopia especular de córnea (MEC) de contato e microscopia eletrônica de varredura (MEV), relatou a importância do uso da microscopia especular de córnea na avaliação quantitativa e qualitativa do endotélio corneal ⁵⁹.

1.3.3 Classificação e modelos dos microscópios especulares de córnea

Atualmente, existem vários tipos de microscópios especulares de córnea disponíveis no mercado, que podem ser classificados quanto à existência ou não de contato com a córnea a ser examinada^{5, 6, 19, 20, 46}.

- **Microscópio Especular de Contato:** faz-se necessária a presença de contato físico entre córnea e lente objetiva. O aparelho possui lentes objetivas de microscópio que aplanam a superfície da córnea. Durante a aplanção da córnea, a curvatura corneal fica mais plana, proporcionando aumento no campo do reflexo especular. Os principais modelos existentes no mercado são: Bio-Optics® modelos LSM 12000, LSM 12000 CT, LSM 2200, LSM 2100E, LSM 2100C, LSM 2000C; Tomey modelo EM-1100 e Konan modelo SP 5500 (Figura 5 A).
- **Microscópio Especular de Não-Contato:** não existe necessidade de contato da córnea em análise com a parte óptica da objetiva do aparelho. Em razão desta falta de contato, não há aplanção da córnea e a maior curvatura da superfície corneal torna menor o campo do reflexo especular, quando comparados com microscópios especulares de contato. Os principais modelos existentes no mercado são: Konan modelos NONCON ROBO® SP-8800, NONCON ROBO® SP-9000, CellChek SP™, CellChek XL™, CellChek EB-10™, Topcon modelos SP 2000P e SP-3000P; Tomey modelo EM 3000 e CSO (Figura 5 B).

Classificados quanto ao modo de análise dos dados:

- **Microscópio especular não automatizado:** o equipamento não oferece recurso para a análise endotelial, que fica a cargo do operador, por meio da comparação do endotélio em análise com a grade predeterminada que fornecem padrões de densidade endotelial, pleomorfismo e/ou polimegetismo.
- **Microscópio especular semiautomatizado:** oferece recursos para a análise endotelial, porém necessita que o operador do equipamento interaja com seu programa e com a imagem endotelial captada para fornecer o valor estimado da densidade endotelial, pleomorfismo e polimegetismo.
- **Microscópio Especular Automatizado:** oferece recursos para a análise endotelial, sem que haja necessidade do operador interagir com o programa do equipamento ou com a imagem endotelial captada para fornecer estimativa da densidade endotelial, pleomorfismo e polimegetismo.

Benetz et al. (1999) concluíram que o sistema de análise de imagem do KONAN NONCON ROBO®-CA SP-8000 poderia ser usado nas triagens clínicas de larga escala para avaliação da perda celular, e que o microscópio especular de não contato oferece vários benefícios clínicos, como conforto do paciente, facilidade de uso do aparelho e pequeno tempo gasto na realização do exame ¹⁶.

Jurkunas e Colby (2005) realizaram análise crítica sobre os vários modelos de microscópios especulares disponíveis no mercado e concluíram que os melhores equipamentos são os semiautomatizados, pela sua precisão e acurácia ⁴⁶.

Fonte: (A) foto Abib, Curitiba, 2008; (B) foto do autor, São Paulo, 2008.

Figura 5 - (A) Microscópio especular de córnea de contato; (B) Microscópio especular de córnea de não contato

1.3.4 Programa para análise das imagens endoteliais

A imagem endotelial captada pelo aparelho é direcionada ao programa do próprio aparelho para as análises quantitativa e qualitativa. A avaliação quantitativa é realizada pela estimativa da densidade endotelial e a avaliação qualitativa, pelo estudo do tamanho e forma das células, presença de estruturas depositadas na superfície endotelial e no estudo das alterações dismórficas do endotélio corneal e/ ou membrana de Descemet. ^{5, 60, 61}.

1.3.4.1 Histórico dos programas

Siertsema et al. (1993) estudaram as amostras endoteliais com programa de análise de imagem, desenvolvido pelos autores, que inseriam diretamente a imagem digitalizada pelo microscópio especular, no computador, com o programa de modificação dessa imagem, assim diminuía o tempo de análise. Para as análises, utilizaram um retículo fixo, cujas bordas celulares internas tinham sido circundadas, eliminando as células cujas bordas tocavam as laterais do retículo. A área de cada célula circundada foi calculada e, com base nessa medida, calcularam-se a densidade celular, a área celular média e seu desvio-padrão. Também se calculou a poligonalidade. Os autores avaliaram de 42 a 92 células por imagem, mas recomendaram que fossem avaliadas de 75 a 100; e concluíram que o método de análise computadorizada em questão teria melhor sensibilidade se fosse associado a um microscópio especular de contato de campo ampliado ⁶².

Landesz et al. (1995) realizaram estudo comparando o programa para análise da imagem endotelial do microscópio especular KONAN NONCON ROBO[®]-CA SP-8000 com o programa dos microscópios especulares ZEISS e KONAN KEELER SP-3300. Os autores concluíram que não se pode fazer um bom intercâmbio entre as informações fornecidas pelos dois programas, que o KONAN NONCON ROBO[®]-CA SP-8000 seria indicado para uma rápida análise morfométrica endotelial e que o KONAN KEELER SP-3300 seria o mais indicado para estudos detalhados e fotografias do endotélio corneal ^{47, 48}.

Vecchi et al. (1996) avaliaram a densidade endotelial corneal, utilizando o microscópio especular TOPCON SP 1000 e programa *Image-NET*[®] nas formas automatizada, semiautomatizada e manual. Concluíram que a forma automatizada não apresenta precisão e acurácia necessária para seu uso clínico. No estudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre forma não automatizada e manual ⁶³.

Benetz et al. (1999) encontraram densidade endotelial significativamente maior na avaliação feita pelo sistema de análise de imagem da KONAN com retículo fixo, quando comparada com densidade endotelial pelo sistema de análise de imagem da Bio-Optics[®] Bambi ¹⁶.

Ohno et al. (1999) estudaram o endotélio corneal de 26 córneas de 13 indivíduos sadios e 41 córneas de 28 indivíduos que tinham sido submetidos à transplante de córnea, pelo microscópio especular de não contato KONAN NONCON ROBO[®]-CA SP-8000 e do microscópio especular de contato KEELER- KONAN SP- 580. Para análise das imagens, utilizou-se o programa Bambi versão 6.1 da Bio-Optics[®], após calibração, com dois métodos: o de marcação dos centros celulares da KONAN NONCON ROBO[®] e o das bordas da Bio-Optics[®] BAMBI. Os autores concluíram que as imagens do microscópio especular automático de não contato podem ser comparadas com as da microscopia especular de contato para aferição da densidade, somente se ambas estiverem adequadamente calibradas para medidas e escalas externas ⁶⁰.

1.3.4.2 Conceitos da morfologia das células endoteliais

A avaliação do endotélio normal baseia-se na estimativa da densidade endotelial, no estudo do tamanho e forma de suas células, na presença de estruturas depositadas na superfície endotelial e no estudo das alterações dismórficas do endotélio da córnea e/ou membrana de Descemet^{3-6, 19, 36, 56, 64-66}.

Por densidade endotelial (DE), entende-se a estimativa numérica das células presentes em cada um dos milímetros quadrados de área existente no mosaico endotelial da córnea. Outra forma de representação deste dado semiológico é pela área celular média em que a unidade de área é o micrômetro quadrado. Estes valores devem ser comparados com aqueles de normalidade para idade do paciente em exame. A densidade endotelial é determinada pela área celular média, conforme relação mostrada na equação 1^{3-6, 19, 20, 36, 56, 64-66}.

$$\text{Densidade endotelial} = \frac{10^6}{\text{Área celular média}} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo densidade endotelial (cel/mm²), área celular média (μm²), e o valor 10⁶ é usado para converter a unidade de medida.

Durante a vida, existe declínio natural da densidade endotelial que pode ser potencializada por trauma ocular, glaucoma, uveítes, procedimentos, tais como cirurgias intraoculares e uso de lente de contato, dentre outras causas^{3-6, 12, 19, 20, 32, 36, 56, 64-70}.

Quando o endotélio corneal humano é lesado, em consequência da cicatrização, ocorre aumento do tamanho celular. O grau de perda das células endoteliais por trauma, doenças ou toxicidade química pode ser documentado pelo exame de microscopia especular de córnea, no qual notamos aumento na área superficial de cada célula e diminuição na densidade endotelial^{3-6, 12, 19, 20, 32, 36, 56, 64-70}.

Ressalta-se que, quando a população destas células atinge um nível crítico, a córnea perde sua transparência, sendo o transplante de córnea, a única forma de restituí-la. O referido nível crítico é conhecido como limiar de descompensação corneal e situa-se entre 700 e 400 células/mm²^{2, 5, 6}.

Polimegetismo é o termo utilizado para denotar heterogeneidade no tamanho das células endoteliais. A população de células endoteliais, normalmente apresenta determinado padrão de dispersão de tamanho em torno de um tamanho médio. Esta dispersão é denominada de polimegetismo e também é indicativa de diminuição da reserva funcional destas células ou mesmo estresse ou sofrimento. O dado semiológico que avalia o polimegetismo é o coeficiente de variação (CV), que descreve a variação das áreas celulares e fornece o valor do polimegetismo. Quando temos aumento no desvio-padrão das médias das áreas celulares, a precisão na estimativa da verdadeira densidade endotelial diminui. Portanto, aumento no polimegetismo causa diminuição na precisão da medida da área celular^{3-6, 19, 36, 56, 64-66}.

O coeficiente de variação é determinado pela equação 2:

$$CV = \frac{\text{DP área celular}}{\text{Área celular média}} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo CV coeficiente de variação, DP como desvio-padrão da área celular média (μm^2), e área celular média (μm^2).

Pleomorfismo é o termo utilizado para denotar a variação do formato hexagonal das células endoteliais da córnea. Este aspecto morfológico celular é avaliado pelo percentual de células com seis lados. Células de seis lados são indicativas da distribuição homogênea na tensão da membrana de superfície e das células normais. O hexágono é o polígono com mais área de superfície relativa a seu perímetro. Assim, a forma celular mais eficiente para cobrir uma área é o hexágono, por exemplo: uma córnea ideal deveria ter o endotélio com 100% de células hexagonais ^{3, 5, 6, 19-21, 56, 64, 65, 71}.

Uma córnea sadia pode se esperar que tenha 60% de suas células endoteliais de forma hexagonal. Diminuição da reserva funcional ou mesmo estresse ou sofrimento das células endoteliais resultará na diminuição da distribuição normal de 60% de células de seis lados ^{3, 5, 6, 19-21, 56, 64, 65, 71}.

1.3.4.3 Métodos de determinação da densidade celular

Alanko e Airaksinen (1981) definiram o método de análise de imagem para determinação da densidade celular pelo retículo fixo (*fixed frame*), pela contagem de células inseridas em um retângulo de área conhecida, desenhado na foto obtida pelo microscópio especular. As células, tocando dois lados perpendiculares do retângulo, não são consideradas na contagem, e a divisão do número de células contadas pela área do retângulo fornece a densidade celular em mm^{-2} (Figura 6).

Fonte: Philips et al., 2005.

Figura 6 - Desenho esquemático do método de análise do retículo fixo: Somente as células dentro do retângulo são consideradas

Benetz et al. (1999) descreveram o método da marcação dos centros celulares para avaliação da densidade endotelial. Marcaram o centro de um grupo de células vizinhas (marcação de, aproximadamente, 50 células) e realizaram o cálculo da densidade celular por mm^2 pela divisão da área celular pelo número de células contadas nesta área ¹⁶ (Figura 7).

Fonte: Abib, 2007.

Figura 7 - Avaliação da densidade endotelial de córnea pelo método de marcação dos centros celulares, realizados pelo programa *Bambi 2000 Plus*. Células marcadas em vermelho e circundadas de amarelo foram consideradas para cálculos da morfologia endotelial, as células marcadas em lilás foram desconsideradas

Phillips et al. (2005) abordaram a determinação da densidade celular pelo método do retículo variável (*variable frame*), que é feito pelo contorno das bordas de um grupo de células escolhidas, recomendando que se conte de 75 a 100 células por imagem. A densidade por mm^2 é calculada pela divisão da área celular pelo número de células contadas desta área. Os autores consideraram esse método mais exato que o do retículo fixo, pois todas as células delimitadas são contadas ⁵ (Figura 8).

Fonte: Philips et al., 2005.

Figura 8 - Desenho esquemático do método de análise do retículo móvel: As bordas de um grupo de células são circundadas

1.3.5 Análise crítica atual da microscopia especular de córnea

Rao et al. (1978) realizaram estudo do endotélio corneal central e periférico pela microscopia especular de contato nos pacientes submetidos à facectomia, após encontrarem um padrão celular endotelial, diferente na periferia em relação à córnea central, concluíram que a microscopia especular não deve ficar confinada à região central, com risco de produzir resultados que não representam o mosaico endotelial ⁹.

Após revisão da literatura disponível sobre microscopia especular, Hirst et al. (1980) afirmaram que algumas questões básicas sobre padronização, reprodutibilidade, documentação e aplicação dos resultados da semiologia do endotélio corneal pela microscopia especular de córnea ainda necessitam de respostas. Apontou alguns problemas metodológicos do exame, como a inacessibilidade ao endotélio corneal periférico (2 a 3 mm do limbo); a dificuldade da microscopia especular de córnea de avaliar áreas com edema; o pequeno número de células avaliadas por alguns autores que contam de 5 a 100 células por imagem, comprometendo a representatividade do exame e, conseqüentemente, a reprodutibilidade do exame; além dos problemas de interpretação, como tempo de seguimento do endotélio de paciente submetido à cirurgia intraocular ⁷³.

Schor e Chamon (1996) consideraram a microscopia especular de córnea exame específico de indicações limitadas e de custo elevado, sendo economicamente viável nos serviços que realizam muitos procedimentos

corneais ou instituições de pesquisa. Concluíram que o exame é muito útil em certas situações, tendo menor importância na prática clínica ⁶¹.

Após revisão da literatura, Abib (2005) concluiu que os aparelhos disponíveis no mercado calculam a mediana e média, desvio-padrão para densidade celular, tamanho celular médio, coeficiente de variação, percentual de células com menos de seis e mais de seis lados e fator de forma. Alguns aparelhos avaliam poucos desses parâmetros, outros são mais completos e avaliam todos, porém nenhum deles fornece o comparativo dos valores encontrados no paciente em exame, com os valores médios verificados na população normal com mesma faixa etária, além de não fornecerem indicação alguma da quantidade de células a serem avaliadas, para que a amostra examinada tenha validade estatística e, conseqüentemente, validade médica ⁷.

Atualmente, as limitações da tecnologia dos microscópios especulares de córnea disponíveis podem ser observadas nos estudos que demonstram aumento da densidade endotelial após procedimentos cirúrgicos intraoculares ⁷⁴⁻⁸⁴. Este aumento da densidade endotelial é improvável de ocorrer após traumatismo cirúrgico e sugere possível viés de amostra. Esse erro amostral já foi identificado e citado em estudos prévios ¹⁰,

1.3.6 Programa para determinação do erro amostral e do tamanho da amostra endotelial

Nos dias atuais, o único programa estatístico com finalidade de análise amostral é o Cells Analyzer PAT. REQ., que complementa a tecnologia dos microscópios especulares existentes, pela incorporação dos resultados obtidos nestes equipamentos, conseguindo o erro amostral e inferindo-lhes validade estatística e, conseqüentemente, médica, para melhor definir diagnósticos e condutas clínicas e/ou cirúrgicas. O programa Cells Analyzer PAT. REQ. calcula o erro amostral em exames já realizados, se é pequeno ou tolerável, grande ou não tolerável; indica o número de células que devem ser consideradas para tornar o resultado do exame endotelial representativo da realidade do mosaico endotelial como um todo ^{7, 87-92}.

Abib (2005) desenvolveu o Cells Analyzer PAT. REQ., programa com finalidade de laboratório estatístico para análise das amostras endoteliais, obtidas pela microscopia especular de córnea. O programa considera o erro existente no processo de amostragem nos exames realizados para orientar o tamanho da amostra endotelial necessária para que o exame adquira confiabilidade e reprodutibilidade, além de realizar análise etária dos dados semiológicos investigados pela microscopia especular de córnea ⁷.

Além disso, o autor citado apontou como limitações do programa Cells Analyzer PAT. REQ. sua utilização com doenças que se caracterizam pela presença de alterações focais do mosaico endotelial, tais como: córnea “guttata”, distrofia de Fuchs, distrofia polimorfa posterior, síndrome endotelial

iridocorneal, dentre outras. O mosaico endotelial deve ser totalmente revestido por células, pois o programa necessita que algumas condições básicas sejam preenchidas para fornecer os dados com maior precisão possível ⁷.

Holzchuh, Hida e Abib (2006) realizaram um dos primeiros estudos com programa Cells Analyzer PAT. REQ., em que o número de células endoteliais contadas em cada imagem, consideradas como amostra, obtidas pelo microscópio especular de contato da marca Bio-Optics® eram analisadas pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ., com dois poderes estatísticos diferentes. O primeiro, com a finalidade de triagem, o grau de confiança era de 90% e o erro relativo planejado de 10%, e o segundo, com a finalidade diagnóstica e de acompanhamento, com grau de confiança de 95% e o erro relativo planejado de 5%. O estudo demonstrou que 100% das amostras obtidas pelo microscópio especular Bio-Optics® continham número de células suficientes apenas para triagem. Só 10% das amostras eram eficientes para diagnóstico, acompanhamento e determinação das características morfométricas do endotélio ⁹¹.

Abib et al. (2007) estudaram o perfil das amostras de células endoteliais com validade e reprodutibilidade estatística pela utilização do programa Cells Analyzer PAT. REQ.. Neste estudo, o tamanho das amostras era determinado pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ., com grau de confiança de 95% e erro relativo planejado de 5%. Os resultados mostraram que, para as amostras obterem tamanho necessário dentro do erro relativo planejado, necessitaram de uma média de $2,35 \pm 1$ imagens diferentes com grande

quantidade de células contadas em cada imagem do mosaico endotelial de cada córnea ⁹³.

Laing e Abib (2007) estudaram a história dos programas de computadores que realizam contagem das células endoteliais da córnea contidas em uma imagem de microscopia especular, de maneira acurada, rápida e automática combinados com o programa Cells Analyzer PAT. REQ.. Os autores concluíram que, atualmente, os programas de computadores combinados com o programa Cells Analyzer PAT. REQ. melhoram o método para obter precisão e validade na contagem e análise dos valores das células endoteliais da córnea, conseguindo melhores informações sobre os parâmetros do endotélio corneal ⁹⁴.

Schaefer et al. (2007) realizaram estudo crítico sobre o número de células endoteliais contadas a cada amostra, obtidas pelo microscópio especular de contato da marca Bio-Optics® e analisadas pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ., com três poderes estatísticos diferentes. O primeiro, com finalidade de triagem, o grau de confiança era de 90% e o erro relativo planejado de 10%; o segundo, com finalidade diagnóstica e de acompanhamento, com grau de confiança de 95% e erro relativo planejado de 5% e o terceiro, com finalidade diagnóstica, de acompanhamento e pesquisa, com grau de confiança de 99% e erro relativo planejado de 1%. O estudo demonstrou que, com grau de confiança de 99% e erro relativo planejado de 1%, todos os exames tiveram número de células endoteliais menores do que o necessário. Isto sugere que a atual tecnologia dos microscópios especulares não está preparada para tal grau de confiança ⁹⁵.

Hida et al. (2009) estudaram 61 imagens endoteliais de córneas de indivíduos normais, obtidas pelo microscópio especular de não contato da marca Konan modelo NONCON ROBO[®] SP-8000[®]. Compararam a relação do número de células contadas com o grau de confiança alcançado nos resultados dos exames de microscopia especular de córnea, com utilização do programa Cells Analyzer PAT. REQ.. A pesquisa concluiu que o número de células contadas tem relação direta com o grau de confiança dos resultados dos exames. Nesse estudo, para que os resultados fossem estatisticamente confiáveis, com o grau de confiança de 95% e erro planejado de 5%, em média, foram necessários a contagem de 418.35 células por exame ⁸⁹.

Melo et al. (2008) realizaram uma investigação que utilizou o programa Cells Analyzer PAT. REQ., para comparar as imagens do endotélio de córneas obtidas pelo exame de microscopia especular de córnea. Concluíram que os dados amostrais sem e com intervenção do programa Cells Analyzer PAT. REQ. , mostraram-se estatisticamente diferentes ⁹².

Abib et al. (em prelo) demonstraram a importância do programa Cells Analyzer PAT. REQ. na rotina dos exames de microscopia especular de córnea, em um estudo que avaliou o erro estatístico e o perfil do tamanho das amostras de células endoteliais nos exames feitos com diferentes microscópios especulares. Na pesquisa, com intervalo de confiança de 95% e erro planejado de 5%, grande quantidade de exames apresentou erro no tamanho da amostra, tornando-os inadequados para realizar a comparação com exames prévios ou futuros da mesma córnea. Concluíram que esses exames necessitavam de número maior de células contadas, assim

aumentando o tamanho das amostras e conferindo-lhes reprodutibilidade e validade médica ⁸⁸.

Abib et al. (2010) demonstraram como o índice de confiança pode melhorar o resultado dos exames de microscopia especular de córnea. O índice de confiança era calculado pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ., que utilizava dados do cálculo do erro amostral, cálculo do tamanho da amostra endotelial, número de células contadas e a proporção da amostra nas amostras com grau de confiança de 95% e erro planejado de 5%. Concluíram que o índice de confiança é útil para melhorar a precisão dos resultados dos exames de microscopia especular de córnea ⁸⁷.

1.4 Relevância

Atualmente, microscopia especular da córnea é a técnica diagnóstica mais utilizada para avaliação qualitativa e quantitativa do endotélio da córnea, sendo importante na prática clínica, sobretudo no pré-operatório de cirurgias intraoculares e seleção de córnea doadora para transplantes, pois determina a vitalidade da córnea. O principal problema desta tecnologia é que nenhum dos microscópios especulares de córnea disponíveis informam quantas células devem ser avaliadas, para que a amostra obtida seja representativa da população total de células endoteliais da córnea. Além disso, nenhum deles permite conhecimento do erro relativo. Consequência desta limitação: pode-se definir a conduta médica com base no suposto

resultado de exame, muitas vezes, impreciso e distante da real situação endotelial, não sendo representativo do mosaico endotelial ⁷.

1.5 Hipóteses

Os dados amostrais endoteliais, tais como: erro relativo planejado, erro relativo calculado, tamanho da amostra pelo número de células contadas e número de células consideradas por exames, quando conduzidos por meio do método lógico podem levar os resultados dos exames de microscopia especular de córnea a patamares menos sujeito à flutuação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Demonstrar valores de referência para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais na faixa etária estudada.

Demonstrar o percentual de células endoteliais marcadas e desconsideradas nos exames de microscopia especular de córnea, quando estes são realizados pelo método de marcação dos centros celulares, ao marcar-se 40, 100 e 150 células, em uma única imagem do mosaico endotelial.

2.2 Objetivos específicos

Demonstrar o número mínimo de células endoteliais a serem incluídas no processo de amostragem endotelial do exame de microscopia especular de córnea, sob orientação do programa Cells Analyzer PAT. REQ..

Demonstrar o erro amostral, calculado pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ., no exame de microscopia especular, ao serem marcadas 40, 100 e 150 células, em uma única imagem do mosaico endotelial.

Demonstrar o erro amostral no exame de microscopia especular, sob orientação do programa Cells Analyzer PAT. REQ., ao serem marcadas mais células do que o número mínimo necessário ao exame.

Demonstrar o percentual de exames corretos, conforme o programa Cells Analyzer PAT. REQ., para exame de microscopia especular, ao serem marcadas 40, 100 e 150 células, em uma única imagem do mosaico endotelial.

Demonstrar o efeito do número de células endoteliais contadas (40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ.) no resultado do exame de microscopia especular, pela descrição do intervalo de confiança das variáveis estudadas: densidade endotelial, área celular, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais.

3 MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Estudo transversal, analítico com amostras obtidas por conveniência.

3.2 Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

O protocolo de pesquisa, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do HCFMUSP, em sessão de 06/08/2008, sob o número 0342/08 (Anexo 1).

3.3 População e amostra

3.3.1 Critérios de inclusão

A amostra constituiu-se de exames de microscopia especular da córnea realizada nos olhos de pacientes, na fase pré-operatória para cirurgia de catarata, agendados por conveniência, provenientes do ambulatório de

Catarata do Departamento de Oftalmologia do HCFMUSP. Os mesmos critérios de seleção foram aplicados em todos os pacientes.

Os pacientes foram agendados para os exames de microscopia especular de córnea, realizados de forma consecutiva, no período de agosto a dezembro de 2008.

O tamanho da amostra foi de 122 olhos, de 61 pacientes, que atendiam aos critérios de inclusão no período.

3.3.2 Critérios de exclusão

Pacientes com qualquer tipo de lesão na córnea ou anexos ao mosaico endotelial, que comprometiam sua superfície posterior, de forma total ou parcial foram excluídos do estudo, como:

1. Doença da córnea
 - I. Córnea *guttata*
 - II. Distrofias
 - III. Síndrome endotelial iridocorneal
2. História de trauma ocular prévio
3. Usuários de lentes de contato
4. Glaucoma
5. Alterações da superfície ocular
6. Alterações estruturais das pálpebras
 - I. Blefaroptose
 - II. Entrópio ou Ectrópio

7. Uveíte
8. Cirurgia ocular prévia
9. Diabetes mellitus
10. Pacientes não colaborativos

Foram excluídos do processo de coleta de dados, 21 pacientes com base nos critérios de exclusão utilizados.

Nenhum dos pacientes com critérios de inclusão preenchidos pelo estudo negou-se a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 2) ou solicitou sua retirada da pesquisa a qualquer momento.

3.3.3 Caracterização da amostra do estudo

A média das idades dos pacientes incluídos no estudo foi de $63,97 \pm 8,15$ anos. Quanto à distribuição por sexo, 31 pacientes (51,67%) foram do sexo masculino e 30 (48,33%), do sexo feminino.

Todas as imagens de microscopia especular foram caracterizadas pelo número de células marcadas na imagem endotelial e pelo número de células consideradas efetivas para o cálculo dos dados da semiologia endotelial.

Para as imagens captadas pelo microscópio especular de córnea, foram calculados os seguintes dados semiológicos endoteliais: número de células consideradas (CC), densidade endotelial em mm^2 (DE), área celular média em μm^2 (ACM), coeficiente de variação (CV) e porcentagem de células hexagonais (HEX).

3.3.4 Caracterização dos grupos do estudo

Cada um dos quatro grupos constituídos caracterizou-se por conter 122 olhos e possuir determinado número de células endoteliais:

- Grupo 40: exames nos quais o centro celular de 40 células foram marcados em uma única imagem endotelial (40 células marcadas);
- Grupo 100: exames nos quais o centro celular de 100 células foram marcados em uma única imagem endotelial (100 células marcadas);
- Grupo 150: exames nos quais o centro celular de 150 células foram marcados em uma única imagem endotelial (150 células marcadas); e
- Grupo CA: exames nos quais foram marcadas tantas células quanto necessárias, em número suficiente de imagens sempre distintas, para obtenção de erro relativo calculado, inferior ao erro relativo planejado (0,05), conforme orientação do programa Cells Analyzer PAT. REQ. para grau de confiança de 95% e metodologia anteriormente citada, em tantas imagens quanto necessárias (número de células marcadas variável). Nos casos que necessitaram mais de uma imagem, foram incluídas todas as células identificadas em cada imagem, utilizando-se sempre uma imagem endotelial a mais que o necessário, para minimizar erro amostral, conforme orientação pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

3.4 Microscopia especular de córnea

3.4.1 Microscópio especular de córnea

A captação das imagens endoteliais foram realizadas com microscópio especular de alta magnificação, semiautomatizado, de não contato, marca Konan, modelo NONCON ROBO[®] SP-8000, com programa de análise próprio chamado KSS-300 (Figura 9).

Fonte: foto do autor, São Paulo, 2008.

Figura 9 - Microscópio especular de não contato Konan, modelo NONCON ROBO[®] SP-8000

3.4.2 Captação das imagens endoteliais

A descrição da técnica utilizada para realização do exame de microscopia especular de não contato foi a preconizada por Abib (2000) ⁶.

- Orientação e posicionamento do paciente;
- Orientação ao paciente para fixação da luz mira existente no aparelho;
- Captura de imagem do endotélio corneal.

Nos casos que necessitaram mais de uma imagem, foram sempre capturadas imagens de diferentes áreas do mosaico endotelial. A primeira imagem capturada sempre foi da região central do mosaico endotelial e as complementares foram realizadas em diferentes áreas desse mosaico: central, para-central superior, para-central medial, para-central inferior e para-central lateral, de forma a propiciarem melhor qualidade para observação das células.

Todos os exames foram realizados no mesmo aparelho, pelo mesmo pesquisador, treinado na obtenção das imagens, processamento e obtenção dos dados das amostras endoteliais.

3.4.3 Marcação das células endoteliais

O examinador utilizou a técnica manual de marcação dos centros celulares, por ser a disponível no aparelho. Após a marcação dos centros celulares, o programa KSS-300 do microscópio especular Konan NONCON

ROBO® SP-8000 utilizou a técnica *center-to-center* para calcular os dados de semiologia endotelial.

A marcação das células na imagem endotelial começou em uma célula na porção central da imagem e, em seguida, as células externas a ela foram marcadas sempre de forma circunferencial, interrompendo-se a marcação sempre que o número de células desejadas era obtido (40, 100, 150 e tanto quanto indicado pelo Cells Analyzer PAT. REQ.).

3.4.4 Determinação das células consideradas para cálculo da semiologia endotelial

Para efeito dos resultados das variáveis endoteliais estudadas, o aparelho considerou somente as células completamente cercadas por outras células, portanto, foram desconsideradas as células endoteliais da linha externa (Figura 10).

3.4.5 Informações endoteliais geradas pelo programa do microscópio especular

Para cada imagem, os dados relatados abaixo foram calculados:

1. Número de células consideradas
2. Densidade Endotelial (células/mm²)
3. Área celular média (μm²)
4. Coeficiente de variação
5. Porcentagem de células hexagonais (%)

Fonte: Foto do autor, São Paulo, 2008.

Figura 10 - Tela do resultado do exame no microscópio especular de não contato Konan, modelo NONCON ROBO® SP-8000, no qual foram marcadas 150 células e o aparelho considerou 109 células (destacado em vermelho)

3.5 Programa Cells Analyzer PAT. REQ. para análise das amostras endoteliais

O programa Cells Analyzer PAT. REQ. (*Corneal Endothelial Statistical Lab*; TechniCall, São Paulo, São Paulo, Brazil) foi utilizado para cálculo do erro amostral existente nas amostras endoteliais, em cada um dos grupos estudados e, para determinação do número mínimo de células a serem incluídas, nos exames de microscopia especular, com finalidade de que os resultados dos exames obtidos fossem estatisticamente representativos da população estudada. Também foi utilizado para cálculo dos dados descritivos das amostras do endotélio e obtenção dos resultados da semiologia endotelial da córnea: densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais (Figura 11).

Fonte: foto do autor, São Paulo, 2008.

Figura 11 - Tela de abertura do programa Cells Analyzer PAT. REQ. com seu índice

3.5.1 Poder estatístico amostral

O poder estatístico amostral escolhido, conforme a orientação do programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.}, para realização deste estudo, foi o grau de confiança de 95% com erro relativo planejado de 5% (0,05) (Figura 12).

The screenshot displays the 'Cells Analyzer' software interface. A red arrow labeled 'A' points to the patient identification fields at the top, which include:

- Número: 15 /
- Nome: AFM
- Solicitante: RICARDO HOLZCHUH
- Data do exame: 02/09/2008
- Nascimento: 11/03/1949
- Sexo: M
- Idade no exame: 59 anos
- Aparelho: NONCAN ROBO SP 8.000

Below these fields, the interface is divided into two main sections for OD (Ocular Density) and OE (Ocular Error). Each section contains a table of parameters and their values:

OD		OE	
Amostra(s)	0	Amostra(s)	0
Densidade endotelial	0	Densidade endotelial	0
Área celular média	0,0 μm^2	Área celular média	0,0 μm^2
Células contadas	0	Células contadas	0
Área avaliada/Equiv	0,0 μm^2	Área avaliada/Equiv	0,0 μm^2
Coefficiente variação	0,000	Coefficiente variação	0,000
Células hexagonais	0,0 %	Células hexagonais	0,0 %
> 6 lados	0,0 %	> 6 lados	0,0 %
< 6 lados	0,0 %	< 6 lados	0,0 %
Shape factor	0,000	Shape factor	0,000

Below the tables, there are radio buttons for 'Standard', 'Personalizada', and 'Standard X'. A red arrow labeled 'B' points to the 'Grau de confiança planejado' (Planned confidence level) section, which shows:

- Standard: 90 %
- Personalizada: 95 % (selected)
- Standard X: 99 %

At the bottom, there are fields for 'Erro relativo calculado' (Calculated relative error) and 'Erro relativo planejado' (Planned relative error), both set to 0,000. The interface also includes a 'Relatórios' (Reports) sidebar on the right with options like 'Amostral', 'Descritivo', 'Réguas', 'Análise final', 'Completo', 'Diagnósticos', and 'Sair'.

Fonte: foto do autor, São Paulo, 2008.

Figura 12 - Tela do programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.} que demonstra: (A) inserção dos dados de identificação do paciente; (B) escolha do grau de confiança

3.5.2 Inserção dos resultados da análise das imagens endoteliais, gerados pelo microscópio especular de córnea, no programa

Cells Analyzer PAT. REQ.

Todo paciente incluído no estudo teve sua idade considerada no Cells Analyzer PAT. REQ. para efeito de análise amostral do mosaico endotelial.

Os dados semiológicos (densidade endotelial, área celular, coeficiente de variação, percentual de células hexagonais e número de células consideradas) calculados pelo programa do microscópio especular de córnea Konan foram inseridos no programa Cells Analyzer PAT. REQ. (Figura 13).

The screenshot displays the 'Cells Analyzer PAT. REQ.' software interface. The main window is titled 'Cells Analyzer' and contains several sections for data entry and analysis.

OD (Ocular Density) Section:

- Mosaico endotelial:** Includes fields for 'Densidade endotelial' (2040 células/mm²) and 'Área celular média' (490,2 μm²).
- Área avaliada no mosaico endotelial:** Includes fields for 'Células contadas' (19), 'Área avaliada' (9313,7 μm²), and 'Equivalente à' (0,10 X 0,10 mm²).

Morfologia celular endotelial Section:

- Polimegetismo:** Includes a field for 'Coeficiente de variação' (0,4100).
- Pleomorfismo:** Includes fields for 'Células hexagonais' (79,0 %), 'Células < 6 lados' (0,0 %), and 'Células > 6 lados' (0,0 %).

Other Fields:

- 'Shape factor' (0,000)
- 'Identificação da imagem' (empty field)

Data Table:

Amostra	Olio	Dens	Area cel	Cel. cont.	Coef. var.	6 lados	> 6 lados	< 6 lados	Setor
1	OD	2040	490,2	19	0,4100	79,0	0,0	0,0	

Buttons and Controls:

- Buttons: Inserir, Alterar, Gravar, Cancela, Apagar, Restaurar, Sair.
- Amostra(s): 0

Fonte: foto do autor, São Paulo, 2008.

Figura 13 - Tela do programa Cells Analyzer PAT. REQ. que demonstra a inserção dos dados semiológicos da imagem endotelial avaliada pela microscopia especular de córnea

3.5.3 Interpretação do erro amostral na primeira imagem

Após a inclusão dos dados semiológicos da primeira imagem endotelial no programa Cells Analyzer PAT. REQ., torna-se necessária a interpretação do erro amostral, para concluir sobre a representatividade das células consideradas:

- Erro relativo calculado maior que o erro relativo planejado (5%) indica tamanho da amostra insuficiente, necessitando ser aumentada com inclusão de mais células no processo amostral do exame (Figura 14).
- Erro relativo calculado menor que erro relativo planejado (5%) indica tamanho da amostra suficiente.

Fonte: foto do autor, São Paulo, 2008.

Figura 14 - Tela do programa Cells Analyzer PAT. REQ. que demonstra a análise dos dados endoteliais da primeira imagem. Seta em vermelho mostra o erro relativo calculado maior que o erro relativo planejado.

3.5.4 Algoritmo da rotina do Cells Analyzer PAT. REQ. para ampliação da amostragem do endotélio

Quando o erro relativo calculado supera o planejado, a amostra é considerada insuficiente no tamanho, e o programa Cells Analyzer PAT. REQ. sugere aquisição de outras imagens endoteliais, em áreas distintas da primeira e inclusão dos dados das demais imagens, com objetivo de ampliá-la.

Neste estudo, a primeira imagem capturada foi de forma padronizada, na região central e as demais imagens foram escolhidas de diferentes regiões do mosaico endotelial para-central, sempre priorizando a região que fornecesse melhor qualidade de imagem.

O processo de amostragem só foi concluído quando o tamanho da amostra endotelial mostrou-se suficiente para validá-lo, com todas as células de tantas distintas imagens quantas se fizeram necessário. Vide algoritmo nos dados da Figura 15.

Fonte: Abib, Curitiba, 2009.

n = número de células; DE: densidade endotelial; ACM: área celular média; CV: coeficiente de variação; HEX: porcentagem de células hexagonais

Figura 15 - Fluxograma demonstrativo da rotina operacional do programa Cells Analyzer PAT. REQ. com as informações necessárias para realização de seus cálculos e sistemática de análise dos resultados calculados

3.5.5 Dados amostrais calculados pelo Cells Analyzer_{PAT. REQ.}

Após obtenção das imagens e células endoteliais necessárias para análise estatística dos exames estudados, os resultados apresentados na tela do programa Cells Analyzer_{PAT. REQ.} (Figura 16) foram os seguintes:

- Número de imagens utilizadas;
- Tamanho da amostra calculado em número de células;
- Número de células incluídas no exame;
- Área endotelial avaliada (μm^2);
- Área endotelial avaliada (mm^2);
- Erro relativo planejado; e
- Erro relativo calculado (erro amostral).

3.5.6 Dados endoteliais totalizados pelo Cells Analyzer PAT. REQ. para os grupos do estudo

- Densidade endotelial estimada e respectivo intervalo de confiança;
- Área celular estimada e respectivo intervalo de confiança;
- Coeficiente de variação estimada e respectivo intervalo de confiança; e
- Porcentagem de células hexagonais estimada e respectivo intervalo de confiança.

Fonte: foto do autor, São Paulo, 2008.

Figura 16 - Tela do programa Cells Analyzer PAT. REQ. que demonstra os dados endoteliais do exame composto de quatro imagens endoteliais e respectiva análise estatística

3.6 Descritivo da metodologia de demonstração dos resultados dos exames endoteliais com respectivos dados amostrais

3.6.1 Valores de referência fornecidos pela população estudada

Para construção da tabela com valores de referência para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais foram utilizados os da estatística descritiva, média e desvio-padrão, e os intervalos tiveram como limites +2 DP, +1 DP, média, -1 DP e -2 DP.

3.6.2 Avaliação do número de células utilizadas e desprezadas para o cálculo dos dados da semiologia endotelial

Com base no número de células contadas em uma única imagem endotelial e do número de células consideradas, nos grupos com 40, 100 e 150 células, foram calculados para o exame realizado pelo microscópio especular Konan, modelo NONCON ROBO® SP-8000:

- Porcentagem de células utilizadas no processo (células consideradas)
- Porcentagem de células desconsideradas no processo

3.6.2.1 Tamanho das amostras calculadas e das amostras realizadas nos exames

Por tamanho das amostras calculadas, entende-se o valor calculado pelo programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.} que determinou o menor número de células incluídas no processo amostral da realização de um exame de microscopia especular.

Por tamanho das amostras realizadas nos exames endoteliais, entende-se o número total de células incluídas no processo de amostragem seguindo o preconizado pelo programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.}, que sugere sempre que possível incluir todas as células de uma imagem a mais que o necessário, para ultrapassar o tamanho da amostra calculado.

3.6.2.2 Número de imagens necessárias para viabilizar o exame de microscopia especular

O número de imagens necessárias nos exames realizados sob orientação do programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.} foi demonstrado em tabela e quantificado por meio de porcentagem.

3.7 Erro Amostral nos grupos estudados

O erro amostral calculado pelo programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.} foi descrito por meio de estatística descritiva, média e desvio-padrão, para os grupos com 40, 100, 150 e com tantas células quanto preconizado pelo programa utilizado.

3.7.1 Exames considerados corretos

Os exames corretos foram considerados os que apresentaram amostra com erro relativo calculado inferior ao erro relativo planejado de 5%. Tanto os exames corretos como os incorretos foram descritos na proporção por meio de porcentagem.

3.7.2 Comportamento do intervalo de confiança para os resultados do exame de microscopia especular

O comportamento do intervalo de confiança foi demonstrado de forma individual para cada olho.

3.7.3 Demonstração, por meio gráfico, da amplitude dos intervalos de confiança para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais nos grupos estudados

A amplitude dos intervalos de confiança para a densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais foi calculada, subtraindo o limite superior do limite inferior e os resultados apresentados em quadros específicos para cada variável endotelial.

3.7.4 Demonstração da diminuição do intervalo de confiança por meio de porcentagem para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais nos grupos estudados

A demonstração do comportamento dos intervalos de confiança com base no percentual de diminuição de sua amplitude para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais terá como referencial inicial o grupo com 40 células marcadas, e este será comparado com os grupos de 100, 150 e com tantas células quanto o programa Cells Analyzer PAT. REQ. preconize. Os resultados foram apresentados em quadros específicos para cada variável endotelial.

4 RESULTADOS

4.1 Valores de referência para a população estudada

Os valores de referência encontrados para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais nos exames sob orientação do programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.}, encontram-se descritos nos dados do Quadro 1.

Quadro 1 - Valores de referência encontrados na população do estudo para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais na população estudada – HCFMUSP - 2008

	DE (cel/mm²)	ACM (μm²)	CV	HEX (%)
Mínimo	1778	309	0,31	64,00
Máximo	3240	562	0,59	38,25
Média	2395,37	423,64	0,40	54,77
DP	294,34	51,09	0,04	4,19

DE: densidade endotelial; ACM: área celular média; CV: coeficiente de variação; HEX: porcentagem de células hexagonais; DP: desvio-padrão

Os valores de referência são representados pela média $\pm$ 1DP e pela média $\pm$ 2 DP para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais (Quadro 2).

Quadro 2 – Valores de referência calculados para densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais - HCFMUSP - 2008

	DE (cel/mm²)	ACM (μm²)	CV	HEX (%)
- 2 DP	1806,69	321,46	0,32	46,39
- 1 DP	2101,03	372,55	0,36	50,50
Média	2395,37	423,64	0,40	54,77
+ 1 DP	2689,71	474,74	0,44	58,96
+ 2 DP	2984,05	525,82	0,48	63,15

DE: densidade endotelial; ACM: área celular média; CV: coeficiente de variação; HEX: porcentagem de células hexagonais; DP: desvio-padrão

O percentual de células endoteliais marcadas e desconsideradas no exame de microscopia especular com 40, 100 e 150 células, em uma única imagem, é observado nos dados do Quadro 3 e Gráfico 1.

Quadro 3 - Percentual de células endoteliais marcadas, consideradas e desconsideradas no exame de microscopia especular com 40, 100 e 150 células, em uma única imagem do mosaico endotelial - HCFMUSP - 2008

Células marcadas	Células consideradas (%)	Células desconsideradas (%)
40	19,52 (48,80%)	20,28 (51,20%)
100	64,93 (64,93%)	35,07 (35,07%)
150	105,26 (70,17%)	44,74 (29,83%)

Gráfico 1 - Percentual de células endoteliais marcadas e desconsideradas no exame de microscopia especular com 40, 100 e 150 células, em uma única imagem do mosaico endotelial - HCFMUSP - 2008

O número mínimo de células endoteliais a serem incluídas no processo de amostragem endotelial, do exame de microscopia especular de córnea, sob orientação do programa Cells Analyzer ^{PAT. REQ.} encontra-se descrito nos dados do Quadro 4, bem como o número de células realizadas no processo amostral, seguindo-se a orientação amostral do mesmo programa.

Quadro 4 – Média do número de células calculado pelo Cells Analyzer ^{PAT. REQ.} e média do número de células efetivamente incluídas no processo amostral - HCFMUSP - 2008

Número e DP de células calculadas pelo Cells Analyzer ^{PAT. REQ.}	Número e DP de células incluídas
247,48 ± 51,61	425,25 ± 102,24

O número de imagens necessárias para realizar o exame de microscopia especular, amostralmente correto, encontra-se descrito em unidades e porcentagem relativa ao número total de exames realizados, nos dados da Tabela 1.

Tabela 1 - Número de imagens necessárias para realizar exame de microscopia especular, amostralmente correto - HCFMUSP - 2008

Número de imagens necessárias	Número de exames amostralmente corretos	Porcentagem de exames amostralmente corretos
Uma imagem	0	0%
Duas imagens	33	27,05%
Três imagens	65	53,28%
Quatro imagens	21	17,21%
Cinco imagens	3	2,46%
Total	122	100%

O erro amostral dos exames de microscopia especular ao serem marcadas 40, 100 e 150 células, em uma única imagem do mosaico endotelial e conforme preconizado pelo programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.} encontra-se transcrito nos dados do Quadro 5.

Quadro 5 - Erro amostral dos exames de microscopia especular ao serem marcadas 40, 100 e 150 células, em uma única imagem do mosaico endotelial e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.}(CA) - HCFMUSP - 2008

Células marcadas	Erro amostral mínimo	Erro amostral máximo	Erro amostral médio com DP
40	0,096	0,268	0,157 ± 0,031
100	0,068	0,312	0,093 ± 0,024
150	0,055	0,115	0,075 ± 0,010
CA	0,023	0,049	0,037 ± 0,005

DP: desvio-padrão

O percentual de exames corretos ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto o método do programa Cells Analyzer PAT. REQ. indique encontra-se descrito nos dados do Quadro 6.

Quadro 6 - Percentual de exames corretos e de exames com amostragem insuficiente ao serem marcadas 40, 100 e 150 células, em uma única imagem do mosaico endotelial e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(CA) - HCFMUSP - 2008

Células marcadas	Quantidade de exames corretos (%)	Quantidade de exames com amostragem insuficiente (%)
40	0 (0%)	122 (100%)
100	0 (0%)	122 (100%)
150	0 (0%)	122 (100%)
CA	122 (100%)	0 (0%)

4.2 Dados relativos ao comportamento dos intervalos de confiança

O efeito do número de células endoteliais contadas sobre a variabilidade do resultado da densidade endotelial encontra-se demonstrado nos dados dos Gráficos 2 e 3, por meio do intervalo de confiança de 95%, para cada um dos grupos estudados, de forma individual para cada olho.

Gráfico 2 – Olho direito: efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da densidade endotelial da córnea, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total) - HCFMUSP - 2008

ep = erro-padrão das médias

Gráfico 3 – Olho esquerdo: efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da densidade endotelial da córnea, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total) - HCFMUSP - 2008

ep = erro-padrão das médias

O efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da área celular média encontra-se demonstrado nos dados dos Gráficos 4 e 5, por meio do intervalo de confiança de 95%, para cada um dos grupos estudados, de forma individual para cada olho.

Gráfico 4 – Olho direito: efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da área celular média (ACM), demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ. (Total) - HCFMUSP - 2008

ep = erro-padrão das médias

Gráfico 5 – Olho esquerdo: efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da área celular média (ACM), demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total) - HCFMUSP - 2008

ep = erro-padrão das médias

O efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado do coeficiente de variação, encontra-se demonstrado nos dados dos Gráficos 6 e 7, por meio do intervalo de confiança de 95%, para cada um dos grupos estudados, de forma individual para cada olho.

Gráfico 6 – Olho direito: efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado do coeficiente de variação, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total) - HCFMUSP - 2008

ep = erro-padrão das médias

Gráfico 7 – Olho esquerdo: efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado do coeficiente de variação, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total). - HCFMUSP - 2008

ep = erro-padrão das médias

O efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da porcentagem de células hexagonais, encontra-se demonstrado nos dados dos Gráficos 8 e 9, por meio do intervalo de confiança de 95%, para cada um dos grupos estudados, de forma individual para cada olho.

Gráfico 8 – Olho direito: efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da porcentagem de células hexagonais, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total) - HCFMUSP - 2008

ep = erro-padrão das médias

Gráfico 9 – Olho esquerdo: efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade do resultado da porcentagem de células hexagonais, demonstrado por meio dos intervalos de confiança ao serem marcadas 40, 100 e 150 células e tantas quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.(Total) - HCFMUSP - 2008

ep = erro-padrão das médias

4.3 Demonstração do comportamento da amplitude dos intervalos de confiança

O comportamento da amplitude dos intervalos de confiança da densidade endotelial (Quadros 7 e 8), área celular média (Quadros 9 e 10), coeficiente de variação (Quadros 11 e 12) e porcentagem de células hexagonais (Quadros 13 e 14) nos grupos estudados, foi demonstrado separado para os olhos direito e esquerdo.

O comportamento da amplitude dos intervalos de confiança, com base no percentual de diminuição de sua amplitude para densidade endotelial (Quadros 7 e 8), área celular média (Quadros 9 e 10), coeficiente de variação (Quadros 11 e 12) e porcentagem de células hexagonais (Quadros 13 e 14) teve como referencial inicial o grupo com 40 células marcadas e foi demonstrado separado para os olhos direito e esquerdo.

Quadro 7 – Olho direito: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da densidade endotelial, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008

GRUPOS	LIMITE SUPERIOR (cel/mm ²)	LIMITE INFERIOR (cel/mm ²)	AMPLITUDE (cel/mm ²)	AMPLITUDE DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA COMPARADOS	PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DA AMPLITUDE
40	2774	2047	727	Não se aplica	Não se aplica
100	2646	2188	458	40 e 100 células	37,00
150	2590	2233	357	40 e 150 células	50,89
CA	2482	2306	176	40 células e número determinado pelo CA	75,79

CA = tantas células quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

Quadro 8 – Olho esquerdo: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da densidade endotelial, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008

GRUPOS	LIMITE SUPERIOR (cel/mm ²)	LIMITE INFERIOR (cel/mm ²)	AMPLITUDE (cel/mm ²)	AMPLITUDE DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA COMPARADOS	PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DA AMPLITUDE
40	2803	2029	774	Não se aplica	Não se aplica
100	2646	2180	466	40 e 100 células	39,79
150	2621	2233	388	40 e 150 células	49,87
CA	2478	2303	175	40 células e número determinado pelo CA	77,39

CA = tantas células quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

Quadro 9 – Olho direito: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da área celular média, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008

GRUPOS	LIMITE SUPERIOR (μm^2)	LIMITE INFERIOR (μm^2)	AMPLITUDE (μm^2)	AMPLITUDE DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA COMPARADOS	PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DA AMPLITUDE
40	488,45	358,23	130,22	Não se aplica	Não se aplica
100	460,37	380,45	79,92	40 e 100 células	38,62
150	451,24	388,82	62,42	40 e 150 células	52,06
CA	440,15	408,84	31,31	40 células e número determinado pelo CA	75,95

CA = tantas células quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

Quadro 10 - Olho esquerdo: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da área celular média, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008

GRUPOS	LIMITE SUPERIOR (μm^2)	LIMITE INFERIOR (μm^2)	AMPLITUDE (μm^2)	AMPLITUDE DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA COMPARADOS	PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DA AMPLITUDE
40	491,39	353,51	137,88	Não se aplica	Não se aplica
100	461,96	384,28	77,68	40 e 100 células	43,66
150	457,58	393,54	64,04	40 e 150 células	53,55
CA	439,66	408,46	31,20	40 células e número determinado pelo CA	77,37

CA = tantas células quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

Quadro 11 - Olho direito: Demonstração dos limites do intervalo de confiança do coeficiente de variação, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008

GRUPOS	LIMITE SUPERIOR	LIMITE INFERIOR	AMPLITUDE	AMPLITUDE DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA COMPARADOS	PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DA AMPLITUDE
40	0,40	0,29	0,11	Não se aplica	Não se aplica
100	0,42	0,34	0,08	40 e 100 células	27,27
150	0,42	0,36	0,06	40 e 150 células	45,45
CA	0,41	0,38	0,03	40 células e número determinado pelo CA	72,72

CA = tantas células quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

Quadro 12 - Olho esquerdo: Demonstração dos limites do intervalo de confiança do coeficiente de variação, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude em comparações realizadas sempre com o grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008

GRUPOS	LIMITE SUPERIOR	LIMITE INFERIOR	AMPLITUDE	AMPLITUDE DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA COMPARADOS	PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DA AMPLITUDE
40	0,43	0,30	0,13	Não se aplica	Não se aplica
100	0,42	0,35	0,07	40 e 100 células	46,15
150	0,43	0,37	0,06	40 e 150 células	53,84
CA	0,42	0,39	0,03	40 células e número determinado pelo CA	76,92

CA = tantas células quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

Quadro 13 - Olho direito: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da porcentagem de células hexagonais, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude em comparações realizadas sempre com o grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008

GRUPOS	LIMITE SUPERIOR (%)	LIMITE INFERIOR (%)	AMPLITUDE (%)	AMPLITUDE DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA COMPARADOS	PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DA AMPLITUDE
40	64,08	47,29	16,79	Não se aplica	Não se aplica
100	61,65	51,03	10,62	40 e 100 células	36,74
150	58,94	50,86	8,08	40 e 150 células	51,87
CA	56,86	52,82	4,04	40 células e número determinado pelo CA	75,93

CA = tantas células quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

Quadro 14 - Olho esquerdo: Demonstração dos limites do intervalo de confiança da porcentagem de células hexagonais, respectiva amplitude e porcentagem de redução de sua amplitude, em comparações realizadas sempre com grupo de 40 células marcadas – HCFMUSP - 2008

GRUPOS	LIMITE SUPERIOR (%)	LIMITE INFERIOR (%)	AMPLITUDE (%)	AMPLITUDE DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA COMPARADOS	PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DA AMPLITUDE
40	63,23	45,88	17,35	Não se aplica	Não se aplica
100	61,95	51,62	10,33	40 e 100 células	40,46
150	58,70	50,54	8,16	40 e 150 células	52,96
CA	56,90	52,86	4,04	40 células e número determinado pelo CA	76,71

CA = tantas células quanto indicadas pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve amostras com faixa etária, variando de 45 a 79 anos e média de $63,97 \pm 8,15$ anos, com concentração na maioria dos casos, das sexta a oitava décadas de vida. Desta forma, os dados dos Quadros 1 e 2 sumarizam os referenciais que podem ser utilizados nos pacientes com a mesma faixa etária. Nossa amostra teve distribuição semelhante quanto ao sexo, pois é sabido que não existem alterações endoteliais significativas entre os sexos.

A amostra deste estudo compôs-se de portadores de catarata, pela facilidade da obtenção dos pacientes do ambulatório de catarata do HCFMUSP e, na literatura médica, encontramos diversas citações utilizando exames de microscópio especular de córnea em grupos de pacientes com catarata^{79, 84, 96-101}.

Na prática oftalmológica clínica e cirúrgica, a microscopia especular de córnea tem aplicação^{20, 102, 103}, sendo útil no estudo de mudanças transitórias e crônicas da morfologia celular endotelial nos usuários de lentes de contato^{69, 104-109}, nos procedimentos cirúrgicos e nos transplantes de córnea¹¹⁰⁻¹¹⁶.

A tecnologia atual para microscópio especular de córnea apresenta limitações quanto à reprodutibilidade e confiabilidade. Diferentes modelos de microscópios especulares, qualidade da imagem especular, área do mosaico endotelial analisada, calibração do aparelho, baixo número de células

marcadas e consideradas são alguns dos fatores que levam a informações com viés^{64, 86, 117}.

Diferentes marcas e tipos de microscópio especular podem influenciar também nos dados descritores do mosaico endotelial, pois cada aparelho possui determinada acurácia nos resultados da análise da imagem. Nenhum deles fornece valores de referência, de acordo com a faixa etária da população estudada, além de não sugerirem a quantidade de células a serem avaliadas para que a amostra tenha validade estatística. Os resultados deste estudo demonstram valores que podem ser utilizados, como referência para idade e para o aparelho utilizado, já que sua calibragem não é dependente de fator humano, e sim automatizada.

A tecnologia atual automatizada permite realização do exame de microscopia especular de forma prática, porém esta simplificação compromete o resultado dos dados gerados. Com a automatização do processo de obtenção das imagens endoteliais de córnea pela microscopia especular, foram sacrificados recursos técnicos que permitiriam amostragem estatisticamente representativa.

Novos estudos são necessários para esclarecer os dados endoteliais entre diferentes marcas de microscópio especular para conhecer, em cada uma delas, o percentual de células desconsideradas nos exames, para então podermos saber quanto a mais de células deveremos considerar, marcar, para obtenção do número desejado.

A qualidade da imagem é outro fator fundamental, pois está diretamente relacionada com identificação das bordas das células, que são

determinantes do número de células visíveis no campo de exame. Cada examinador pode ter habilidades subjetivas diferentes para identificar uma célula individualmente.

Benetz et al. (2006) mostraram que na avaliação da qualidade de 688 imagens por dois examinadores distintos, a avaliação foi similar em apenas 64% das vezes, assim os autores concluíram que a avaliação das imagens do microscópio especular de córnea em um estudo são melhores, quando apenas um examinador as faz ¹⁷. Em nosso estudo, apenas um examinador realizou todos os exames.

Para possibilitar a marcação das células pelo examinador, é de extrema importância obter imagem nítida das bordas celulares endoteliais geradas pelo microscópio especular, independente da técnica de marcação utilizada. Portanto, a qualidade da imagem está diretamente relacionada à quantidade de células contíguas nítidas de uma imagem especular.

McCarey et al. (2008) descreveram a relação entre qualidade de imagem e quantidade de células visíveis no campo da fotografia endotelial gerada pelo microscópio especular. Quando uma boa imagem é obtida, 75% a 100% das células podem ser contadas pelo examinador. Quando a imagem é razoável, 50% a 74% das células podem ser contadas. Quando a imagem é ruim, apenas 25% a 49% podem ser contadas. Quando contamos menos de 25% das células no campo especular, a imagem é inadequada e sugere-se obter uma nova imagem ²⁰.

No presente estudo, só foram consideradas imagens de boa qualidade pelo critério de McCarey et al. Não houve dificuldades para

observar as bordas das células, porque os exames foram realizados em pacientes com córneas transparentes, sem edemas ou outras doenças.

Para avaliar se a contagem endotelial é suficiente para uma amostra ter erro amostral inferior a 5%, os idealizadores do método, ora estudado, desenvolveram um programa com a finalidade de laboratório estatístico, para o exame de microscopia especular de córnea, o chamado Cells Analyzer^{PAT. REQ.}. Este programa determina o erro existente no processo de amostragem nos exames realizados, orientando o tamanho da amostra endotelial a ser considerada para que o exame adquira maior confiabilidade e melhor reprodutibilidade. Também fornece o comparativo dos valores encontrados no paciente examinado, com valores médios verificados na população normal da mesma faixa etária, armazenados no banco de dados do programa⁹², porém este recurso não foi o objetivo do presente estudo.

O programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.}, por ser um laboratório estatístico desenvolvido para o cálculo amostral e análise do endotélio corneal, necessita que algumas condições básicas sejam preenchidas para fornecer os dados com maior precisão possível. O examinador deve inserir no programa numerações sem erro, pois qualquer erro na colocação dos dados afeta todo cálculo estatístico.

O mosaico endotelial não deve apresentar doença que se caracterize pela presença de alterações focais isoladas, tais como: córnea *guttata*, distrofia de Fuchs, distrofia polimorfo posterior, síndrome endotelial iridocorneal, dentre outras. A variação do tamanho e morfologia das células não afeta a objetividade do programa estatístico.

O programa estatístico propõe-se a analisar as amostras com maior número de células contadas possíveis a cada imagem endotelial, pela captura de tantas imagens quantas necessárias para obtenção de erro relativo inferior ao planejado (5%). Nos casos com necessidade de mais de uma imagem, foram incluídas todas as células identificadas em cada imagem. Na rotina do Cells Analyzer^{PAT. REQ.}, sugerem incluir para minimizar erro amostral, todas as células de uma imagem a mais que o número de imagem necessária.

Na literatura médica, o cálculo do tamanho de uma amostra para que esta represente fielmente determinada população, devem ser estabelecidos alguns parâmetros estatísticos, que são o grau de confiança e o erro relativo planejado. Os principais níveis de significância estatística utilizados na medicina para o cálculo de tamanho de amostra são ¹¹⁸⁻¹²¹:

- grau de confiança de 95% com erro relativo planejado de 0,05 ou 5%;
- grau de confiança de 99% com erro relativo planejado de 0,01 ou 1%.

Na análise dos dados da microscopia especular de córnea, o grau de confiança de 95% com erro relativo planejado de 5% determina amostras, cujo número de células pode estar contido entre uma a dez imagens ^{88, 89, 91, 93, 95}. No estudo do perfil das amostras de células endoteliais com validade e reprodutibilidade estatística, Abib et al. (2007) demonstraram que, com a magnitude do mosaico endotelial fotografado pelo microscópio especular de contato Bio-Optics[®], o número médio de imagens foi de $2,37 \pm 1,05$ imagens e o maior número foi de sete imagens ⁹³. Este grau de confiança pode ser utilizado para triagem no acompanhamento de casos clínicos e na pesquisa

endotelial. Desta forma, o exame realizado com este grau de confiança adquire objetividade e reprodutibilidade, além de ser operacionalmente viável.

O grau de confiança de 99% não foi usado no estudo, pois o tamanho das amostras, conforme demonstraram Schaefer et al. (2007) e Abib et al. (2010), variou de 3.000 a 9.000 células^{87, 95}. É sabido que a atual tecnologia dos microscópios especulares disponíveis no mercado mundial não viabiliza exames nas múltiplas áreas do mosaico endotelial, que possam totalizar essa quantidade de células.

Os valores encontrados para as variáveis (densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais) foram apresentados, na faixa de intervalo do segundo desvio padrão positivo ao segundo desvio-padrão negativo (Quadro 2). Por apresentar ampla possibilidade de variação para estas variáveis, este intervalo foi estratificado em quatro faixas: segundo desvio-padrão positivo, primeiro desvio-padrão positivo, primeiro desvio-padrão negativo e segundo desvio-padrão negativo. A amplitude dos valores destas variáveis foi estratificada para permitir melhor análise do comportamento endotelial nos casos de intervenção cirúrgica intraocular.

A vantagem desta estratificação reside no fato de que os pacientes com densidade pouco abaixo da média, no intervalo do primeiro desvio-padrão negativo, apresentam comparativamente a pacientes com densidade mais diminuída, no intervalo do segundo desvio-padrão negativo, menor reserva de células endoteliais para cirurgias intraoculares^{7, 118-121}.

Na realização do exame endotelial em questão, é importante o número de células marcadas na imagem endotelial e o número de células consideradas para o cálculo da densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais. A maioria dos microscópios especulares disponíveis só utiliza as células marcadas para gerar os resultados da amostra e muitas células são descartadas pelo programa, já que a técnica de marcação dos centros celulares (*center-to-center*), a mais utilizada, considera em sua contagem somente as células cercadas de outras células^{16, 122, 123}.

Portanto, ao fazer a marcação em uma célula hexagonal e nas seis outras contíguas, o resultado da análise será a área de uma célula de seis lados. Neste exemplo, sete células foram usadas para definir a área de uma única célula. Assim, o número de células que compõe a linha externa de células é utilizado, não para o cálculo das respectivas áreas das células que a constituem, mas, só para a determinação do número de lados das células adjacentes.

No processo da determinação de parâmetros para análise da morfologia celular endotelial, parte da amostra endotelial perde-se porque quando se contam poucas células, aproximadamente, metade delas é desconsiderada⁹⁰.

No estudo, ao serem contadas 40 células, pouco mais da metade do número marcado foi desconsiderado⁹⁰. Com a marcação de 100 células, aproximadamente, 35% delas foram desconsideradas e ao se marcarem 150 células, quase, 30% das células foram desconsideradas. O conhecimento

destas porcentagens auxilia o examinador na etapa da captação da amostra endotelial.

Hirst et al. (1984), Hirst et al. (1989) e Vecchi et al. (1996) afirmaram que, quanto mais células forem consideradas, mais objetivo e preciso será o resultado do exame^{63, 122, 123}.

Existe gradual diminuição do número de células desconsideradas à medida que mais células são contadas em uma mesma imagem do mosaico endotelial. Isso é demonstrado claramente ao se contarem praticamente todas as células de uma única imagem, como no grupo 150, tendo estas tamanho normal, aproximadamente, 30% delas serão desconsideradas. (Quadro 3 e Gráfico 1)

A rotina do grupo CA preconizou que se contassem todas as células das imagens utilizadas, tendo estas células tamanho normal, serão incluídas por imagem endotelial quase sempre o mesmo número de células, com perdas semelhantes em termos de porcentagem para as células consideradas e desconsideradas.

O número teórico mínimo de células endoteliais a serem incluídas no processo de amostragem endotelial do exame de microscopia especular de córnea, calculado inicialmente pelo programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.}, foi $247,48 \pm 51,61$ e o número de células executado sob orientação do programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.} foi $425,25 \pm 102,24$.

Nas condições do estudo, o número teórico mínimo de células endoteliais a serem incluídas no processo de amostragem endotelial do exame de microscopia especular de córnea, calculado pelo programa Cells

Analyzer PAT. REQ., foi sempre inferior ao número de células consideradas, pois o Cells Analyzer PAT. REQ. preconiza contar todas as células de outra imagem, além da imagem responsável por se ultrapassar o número calculado. Esta metodologia minimiza o erro amostral, pois se forem consideradas poucas células a mais que o número calculado, a existência de área do mosaico endotelial não fotografada e analisada, com morfologia celular mais heterogênea, pode mudar o tamanho amostral e assim aumentar o número calculado.

O número de imagens necessárias para realizar exame de microscopia especular de córnea amostralmente correto, segundo rotina do programa Cells Analyzer PAT. REQ., variou de duas a cinco imagens, e para pouco mais da metade dos casos, três imagens foram necessárias. O número de diferentes imagens captadas pelo exame foi das regiões central e paracentral, pelo fato dos aparelhos disponíveis só capturarem imagens dessas regiões, conforme informado pelos fabricantes dos aparelhos mais modernos^{16, 46, 124-126}.

Os microscópios especulares de córnea, que não calculam a porcentagem de células hexagonais, consideram todas as células marcadas, porém, a análise do mosaico endotelial examinado fica desprovida desse dado, que é importante indicativo de atividade cicatricial do endotélio. Exemplo são os microscópios especulares de córnea das marcas CSO e TOPCON SP2000D, que em sua versão TOPCON SP3000P já o incluem entre os dados calculados.

Ao serem marcadas 40 células de uma imagem endotelial e utilizadas pouco menos da metade desse número, o erro amostral mostrou-se próximo a 16% (0,157), muito superior aos 5%, limite preconizado pela ciência médica ¹¹⁸⁻¹²¹. Ao serem marcadas 100 células de uma imagem endotelial, o erro amostral mostrou-se ainda superior aos 5%.

Nos exames em que se marcaram 150 células de uma imagem endotelial, o erro amostral mostrou-se ainda superior a 5% na grande maioria das córneas examinadas. Em poucos casos, uma única imagem foi suficiente, do ponto de vista numérico; mas, pela possibilidade de existir em áreas distintas da examinada no mosaico endotelial, com morfologia celular mais heterogênea, foi utilizada a contagem das células de mais uma imagem, conforme preconizado pela metodologia do processo contido no programa Cells Analyzer PAT. REQ.·

Ao serem marcadas tantas células quanto preconizadas pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ., o erro amostral mostrou-se inferior a 5% em 100% dos casos. Os resultados calculados para cada uma das necessárias e sempre distintas imagens endoteliais, após serem sumarizados pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ., serão apresentados na forma de régua estatístico-analíticas, comparando-se a densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais com valores de normalidade para idade do paciente examinado. Este recurso não será discutido por não ser objetivo do presente estudo.

Ao se analisar os dados do Quadro 6, nos quais é demonstrado o percentual de exames amostralmente corretos e de exames com amostragem insuficiente nos grupos estudados, fica evidente a transformação de todos os casos estudados, de exames com amostras insuficientes a exames com amostras suficientes. O fator determinante para esta transformação do perfil amostral foi a utilização do método contido no programa Cells Analyzer PAT. REQ.

Oliveira et al. (2009) estudaram dados endoteliais nos pacientes com uveítes infecciosas e não infecciosas, contando apenas 10 a 15 células ⁸². Laing et al. (1976) relataram que o número de células endoteliais contadas para se obter a máxima precisão era de 30 células ¹⁵. Doughty et al. (2000) sugeriram, pelo menos, 75 células por exame ¹¹⁷. Muitos estudos utilizaram, aproximadamente, 50 células marcadas ^{75, 78, 79, 84}. Inaba et al. (1985) preferiram contar 100 células por exame ¹²⁷. Todos os autores aqui citados preconizaram o número de células por exame insuficiente, quando comparado com tamanho da amostra endotelial, com erro estatístico inferior a 5%.

Na literatura mundial, Binder et al. (1979) foram os autores que mais se aproximaram do real tamanho das amostras, para que os resultados da microscopia especular de córnea fossem considerados representativos da realidade. Assim, preconizaram que fossem consideradas todas as células de três imagens distintas ¹¹.

Quando comparamos a rotina preconizada por Binder et al. com a de nosso estudo, 53,28% dos casos seriam corretos para realização da

microscopia especular de córnea, pois necessitaram de apenas três imagens para concluir o exame ¹¹. Em nosso estudo, 27,05% dos exames foram realizados só com duas imagens, assim a rotina preconizada por Binder et al. seria responsável por maior tempo gasto na realização desta porcentagem de exames. Ainda em nosso estudo, 19,67% dos exames foram realizados com quatro ou cinco imagens distintas, a rotina preconizada por Binder et al. seria responsável por exames com amostras insuficientes na realização desta porcentagem de exames.

Neste estudo, quando marcadas 40 células obteve-se média de 19,52 (48,8%) células consideradas e média de 20,28 (51,2%) células desconsideradas. Quando marcadas 100 células obteve-se média de 64,93 (64,93%) células consideradas e média de 35,07 (35,07%) células desconsideradas. Quando marcadas 150 células obteve-se média de 105,26 (70,17%) células consideradas e média de 44,74 (29,83%) células desconsideradas. Portanto, observou-se que, quanto maior o número de células marcadas maior será o número de células consideradas.

Conforme rotina preconizada pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ. nenhum dos exames foi considerado amostralmente correto, seja com 40, 100 ou 150 células marcadas. Mas, todos foram considerados amostralmente corretos, quando a rotina preconizada foi seguida, considerando todas as células dos processos amostrais, contendo entre duas e cinco imagens. Na literatura, não existe um consenso sobre quantas células devem ser contadas. Isso irá depender da morfologia das células endoteliais das córneas a serem examinadas.

A demonstração do efeito do número de células endoteliais sobre a variabilidade dos resultados da densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais foi estudada por meio do intervalo de confiança de 95% para os grupos, nos quais foram contadas 40, 100 e 150 células e também para o grupo, no qual foram contadas tantas células quanto preconizadas pelo método contido no programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.}. A demonstração desta variabilidade nos resultados do intervalo de confiança de 95% para olhos direito e esquerdo foi estudada separadamente com objetivo de evitar viés.

Ficou evidente o efeito do número de células contadas sobre a amplitude do intervalo de confiança de 95% para densidade endotelial. (Gráficos 2 e 3)

Por meio da interpretação dos dados do Gráfico 2 que sumarizam os resultados dos intervalos de confiança para a densidade endotelial nos olhos direito e do Gráfico 3 que sumarizam os resultados dos intervalos de confiança para a densidade endotelial nos olhos esquerdo dos mesmos pacientes, fica evidente a gradual e importante diminuição existente na amplitude de variação dos resultados encontrados.

Conforme demonstrado nos dados dos Quadros 7 e 8 para os olhos direito e esquerdo, respectivamente, evidencia-se que a amplitude do intervalo de confiança para densidade endotelial, em que se comparam os grupos com 40 e 100 células contadas, estes têm suas amplitudes diminuídas em 37,00% e 39,79% para os olhos direito e esquerdo, respectivamente. Evidencia-se também que a amplitude do intervalo de

confiança para a densidade endotelial, no qual se comparam os grupos com 40 e 150 células contadas, estes têm suas amplitudes para os olhos direito e esquerdo diminuídas de 50,89% e 49,87%, respectivamente.

Ao se utilizar o método contido no programa Cells Analyzer^{PAT. REQ.}, evidencia-se que a amplitude do intervalo de confiança para a densidade endotelial, em que se comparam os grupos com 40 e o CA, estes têm suas amplitudes diminuídas em 75,79% e 77,39% para os olhos direito e esquerdo, respectivamente.

O efeito do maior número de células incluídas na amostragem endotelial dos exames de microscopia especular de córnea comprova a diminuição da variação do intervalo de confiança para a densidade endotelial, desta forma, se forem repetidos exames em um mesmo paciente de forma seriada, no intervalo de tempo, não suficientemente amplo para existir perda celular pela idade, ocorrerá menor flutuação entre os resultados, se as amostras forem constituídas de maior número de células. O limiar para se contar células, sob o ponto de vista da estatística médica, é tornar a amostra com erro inferior a 5%.

Conforme demonstrado por Schaefer et al. (2007), o erro amostral inferior a 1% determina amostra com alguns milhares de células endoteliais, e os atuais microscópios especulares disponíveis não conseguem capturar número de diferentes imagens para se obter amostras tão grandes⁹⁵. Atualmente, considera-se improvável a realização de exames endoteliais *in vivo* com esse erro amostral.

O órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pela saúde e serviços humanos (*Food and Drug Administration* - FDA) comenta sobre a flutuação de resultados do exame de microscopia especular realizado nos pré e pós-operatórios de facoemulsificação.

No pós-operatório, evidenciou-se o valor de média do grupo estudado superior ao valor verificado para a densidade endotelial no pré-operatório. Por ser a mitose endotelial na espécie humana rara e clinicamente não significativa, isto foi indicado pelo FDA, como sendo em razão de erro no processo da amostragem endotelial nos exames realizados ⁸⁵.

O método estudado por meio do programa Cells Analyzer PAT. REQ. demonstrou efetiva diminuição da amplitude do intervalo de confiança da densidade endotelial estimada em até, aproximadamente, 75%, elevando a confiabilidade do exame a novo patamar, no qual se ultrapassa o limite de 5%, em 100% dos exames realizados, para o erro amostral tolerado pela ciência médica. Nesse estudo, o erro amostral médio obtido foi de 3,7% nos exames realizados com orientação do método preconizado pelo Cells Analyzer PAT. REQ.

Outros estudos que incidem nesse erro metodológico, podem ser citados:

Tan et al. (2001) realizaram estudo, avaliando a eficácia de um dispositivo de liberação lenta de dexametasona colocada na câmara anterior, após cirurgia de facectomia com implante de lente intraocular. Estes autores observaram aumento da densidade endotelial de 2.481 cel/mm² (3 meses após cirurgia) para 2.506 cel/mm² (12 meses após cirurgia). O estudo

também não mostrou a quantidade de células avaliadas na análise da densidade endotelial ⁸³.

Maar et al. (2001) mostraram aumento na densidade endotelial de 1% a 2%, após estudarem a influência de dois viscoelásticos na cirurgia de facectomia ⁸⁰.

Lackner et al. (2004) mostraram grande aumento da densidade endotelial de 2.478 cel/mm² (pré-operatório) para 2.639 cel/mm² (1 mês depois da cirurgia), após implante de lente intraocular fática de câmara posterior. Em outro grupo estudado, os autores novamente relataram aumento de 2.538 cel/mm² (1 ano após cirurgia) para 2.884 cél/mm² (2 anos após cirurgia) ⁷⁸.

Guell et al. (2008) relataram aumento da densidade endotelial de 2.548 cel/mm² (2 anos após cirurgia) para 2.625 cel/mm² (3 anos após cirurgia) e depois para 2.791 cél/mm² (4 anos depois da cirurgia), após implante de lente intraocular fática para miopia, hipermetropia e astigmatismo ⁷⁴.

Esta foi uma das motivações científicas para o desenvolvimento deste estudo com o único recurso atualmente disponível para orientação na realização do exame da microscopia especular de córnea e análise amostral dos dados dos exames em discussão.

O uso do método estudado por meio do programa Cells Analyzer ^{PAT. REQ.} na rotina da realização dos exames de microscopia especular de córnea, com exceção dos casos de distrofia, no qual o mosaico endotelial encontra-se já afetado por estruturas complexas, atualmente, é o recurso

disponível para minimizar erro amostral nestes exames em nível tolerado pela medicina. Zerar o erro amostral nos exames de microscopia especular de córnea significaria considerar, para efeito de cálculo dos dados endoteliais obtidos no exame, todas as células endoteliais da córnea, o que é improvável com a atual tecnologia.

Há uma razão matemática pela qual a densidade endotelial, estimada em 1mm^2 é transformada em área celular média, estimada em μm^2 , conforme demonstrado por Abib (2005) ⁷. A dupla possibilidade de interpretação do mosaico endotelial, pela densidade endotelial ou pela área celular média, é mais evidente ao raciocínio clínico a compreensão da importância clínica da densidade endotelial da córnea.

Ficou evidente também o efeito do número de células contadas sobre a amplitude do intervalo de confiança, de 95%, para a área celular média. (Gráficos 4 e 5)

Por meio da interpretação dos dados do Gráfico 4 que sumarizam os resultados dos intervalos de confiança para a área celular média nos olhos direito e dos dados do Gráfico 5 que sumarizam os resultados dos intervalos de confiança, para a área celular média nos olhos esquerdo dos mesmos pacientes, fica evidente a gradual e importante diminuição existente na amplitude de variação dos resultados encontrados.

Conforme demonstrado nos dados dos Quadros 9 e 10 para os olhos direito e esquerdo, respectivamente, evidencia-se que a amplitude do intervalo de confiança para a área celular média, quando se comparam os grupos com 40 e 100 células contadas, estes têm suas amplitudes para os

olhos direito e esquerdo diminuídas em 38,62% e 43,66%, respectivamente. Nota-se também que a amplitude do intervalo de confiança para a área celular média, no qual se comparam os grupos com 40 e 150 células contadas, estes têm suas amplitudes para os olhos direito e esquerdo diminuídas em 52,06% e 53,55%, respectivamente.

Ao se utilizar o método contido no programa Cells Analyzer PAT. REQ. evidencia-se que a amplitude do intervalo de confiança para a área celular média, que comparam os grupos com 40 células contadas e o grupo CA, estes têm suas amplitudes para os olhos direito e esquerdo diminuídas em 75,95% e 77,37%, respectivamente.

O efeito do maior número de células incluído na amostragem endotelial dos exames de microscopia especular de córnea comprova a diminuição da variação do intervalo de confiança para área celular média. Se forem repetidos exames em um mesmo paciente de forma seriada, em um intervalo de tempo, não suficientemente amplo para existir perda celular pela idade, ocorrerá menor flutuação entre os resultados se as amostras forem constituídas de maior número de células. O limiar para se contar células, sob o ponto de vista da estatística médica, é tornar a amostra com erro inferior a 5%, conforme demonstrado por Abib et al (2007) ⁹³.

A densidade endotelial por ser informação descritiva do mosaico endotelial é de mais fácil compreensão, tanto na pesquisa como na clínica e cirurgia ocular ^{12, 128-134}, poucos autores priorizam o estudo da área celular média ^{19, 62, 73, 135}.

Neste estudo, o erro amostral médio obtido foi de 3,7% nos exames realizados com orientação do método preconizado pelo Cells Analyzer PAT. REQ.. Isto determina menor flutuação entre resultados da área celular média nos exames seriados realizados sempre com orientação metodológica preconizada pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ..

Existe uma razão matemática pela qual o coeficiente de variação é estimado, na qual se considera a razão do desvio-padrão de uma quantidade de células consideradas pela sua área celular média, conforme descrito por Abib (2000). Este coeficiente mensura o polimegetismo existente em uma amostra endotelial ⁶.

Ficou evidente o efeito do número de células contadas sobre a amplitude do intervalo de confiança de 95% para o coeficiente de variação. (Gráficos 6 e 7)

Por meio da interpretação dos dados do Gráfico 6 que sumarizam os resultados do intervalo de confiança para coeficiente de variação nos olhos direito e dos dados do Gráfico 7 que sumarizam os resultados do intervalo de confiança para o coeficiente de variação nos olhos esquerdo dos mesmos pacientes, fica evidente a gradual e importante diminuição existente na amplitude de variação dos resultados encontrados.

Nota-se que a amplitude do intervalo de confiança para o coeficiente de variação, quando se comparam os grupos com 40 e 100 células contadas, estes têm suas amplitudes para os olhos direito e esquerdo diminuídas em 27,27% e 46,15%, respectivamente, com diferencial entre olhos direito e esquerdo de 18,88%. (Quadros 11 e 12) Normalmente, na

comparação entre diminuição da amplitude do intervalo de confiança de 95% entre olhos direito e esquerdo não se evidenciam diferenças similares, mas este fato pode ocorrer em razão das amostras de um olho terem sido consideradas com o número pequeno de células mais homogêneas no tamanho e, nas amostras do olho contralateral, terem sido consideradas também com o número pequeno de células, agora com morfologia mais heterogênea no tamanho de células.

Evidencia-se também que amplitude do intervalo de confiança para o coeficiente de variação, quando se comparam os grupos com 40 e 150 células contadas, estes têm suas amplitudes para os olhos direito e esquerdo diminuídas em 45,45% e 53,84%, respectivamente. Nota-se que a diferença entre olhos direito e esquerdo foi menor, tendo diferencial de 8,39%, o que pode ser explicado pelo aumento do número de células consideradas.

Ao se utilizar o método do programa Cells Analyzer PAT. REQ. evidenciou-se que a amplitude do intervalo de confiança para o coeficiente de variação, quando se comparam os grupos com 40 e o CA, estes têm suas amplitudes para os olhos direito e esquerdo diminuídas em 72,72% e 76,92%, respectivamente. Nota-se que a diferença entre olhos tornou-se ainda menor, tendo diferencial de 4,2%, o que pode ser explicado pelo aumento do número de células consideradas que supera o número mínimo indicado pelo método contido no programa Cells Analyzer PAT. REQ.

O efeito do maior número de células incluído na amostragem endotelial dos exames de microscopia especular de córnea comprova a

diminuição da variação do intervalo de confiança para o coeficiente de variação. Portanto, se forem repetidos exames em um mesmo paciente de forma seriada, sem que exista estímulo lesivo endotelial, ocorrerá menor flutuação entre os resultados, se as amostras forem constituídas de maior número de células.

O efeito do número de células contadas sobre a amplitude do intervalo de confiança de 95% ficou evidente para a porcentagem de células hexagonais. (Gráficos 8 e 9)

Na interpretação dos dados do Gráfico 8, que sumarizam os resultados do intervalo de confiança para a porcentagem de células hexagonais nos olhos direito e dos dados do Gráfico 9, que sumarizam os resultados do intervalo de confiança para porcentagem de células hexagonais nos olhos esquerdo dos mesmos pacientes, ficou evidente a gradual e importante diminuição existente na amplitude de variação dos resultados encontrados.

Observa-se que a amplitude do intervalo de confiança para a porcentagem das células hexagonais, quando se comparam os grupos com 40 e 100 células contadas, estes têm suas amplitudes para os olhos direito e esquerdo diminuídas em 36,74% e 40,46%, respectivamente. Nota-se que a diferença entre olhos foi de 3,72%. (Quadro 13 e 14)

Evidenciou-se também que a amplitude do intervalo de confiança para a porcentagem de células hexagonais, quando se comparam os grupos com 40 e 150 células contadas, estes têm suas amplitudes para os olhos direito e

esquerdo diminuídas em 51,87% e 52,96%, respectivamente. Nota-se que a diferença entre olhos foi de 1,09%.

Ao se utilizar o método contido no programa Cells Analyzer PAT. REQ., verifica-se que a amplitude do intervalo de confiança para porcentagem de células hexagonais, na qual se comparam os grupos com 40 e o CA, estes têm sua amplitude para os olhos direito e esquerdo diminuídas em 75,93% e 76,71%, respectivamente. Portanto, a diferença entre os olhos foi de 0,78%.

A diferença entre os olhos direito e esquerdo para o coeficiente de variação sofreu mais efeito do menor número de células endoteliais que a porcentagem de células hexagonais, ao serem consideradas as comparações dos grupos em que se contam 40 e 100 células, 40 e 150 células, 40 e o número de células preconizado pelo método do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

O efeito do maior número de células incluído na amostragem endotelial dos exames de microscopia especular comprova a diminuição da variação do intervalo de confiança para a porcentagem de células hexagonais. Em um mesmo paciente, se forem repetidos os exames de forma seriada, sem que exista estímulo lesivo endotelial, ocorrerá menor flutuação entre os resultados se as amostras forem constituídas de maior número de células.

O método contido no programa Cells Analyzer PAT. REQ. tem como finalidade a mensuração de parâmetros morfométricos do mosaico endotelial (densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais) a mais precisa possível e a

comparação dos resultados encontrados com valores representativos de normalidade para idade do paciente examinado.

Para melhorar a representatividade dos resultados do exame de microscopia especular de córnea, tem-se como sugestão a utilização do método contido no programa Cells Analyzer PAT. REQ.

Em nosso estudo, destacam-se alguns pontos positivos, quando se analisam os resultados. O programa utilizado tem como finalidade determinar o tamanho mínimo de amostra para cada córnea examinada de forma que, ao se concluir o processo amostral de cada córnea, os resultados sejam representativos da realidade do mosaico endotelial central e de média periferia a erro amostral aceito pela ciência médica.

Neste estudo, o microscópio especular de córnea utilizado foi da marca Konan, modelo Noncon Robo[®] SP-8000. Este aparelho foi de fácil utilização, pois é de não contato, não precisa tocar na córnea dos pacientes, o que possibilitou exames em todos os pacientes de forma rápida. O aparelho também captura as imagens do mosaico endotelial de forma automática, sendo necessário só escolher a região da córnea, central ou paracentral, para realização do exame. Na grande maioria dos casos, as imagens eram nítidas, adequadas para efetuar o exame. O programa Cells Analyzer PAT. REQ. é um laboratório estatístico que influenciou diretamente na diminuição da variabilidade dos resultados finais das microscopias especulares de córnea. O mesmo deverá ocorrer com exames realizados com outras marcas e modelos de microscópio especular.

O programa Cells Analyzer PAT. REQ. trabalha estatisticamente os resultados obtidos baseados nas imagens endoteliais utilizadas, o programa não influencia na precisão do cálculo da densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais calculados pelo microscópio especular de córnea, para cada imagem capturada.

Este programa finaliza os resultados do exame, apoiados nas informações geradas pelo microscópio especular de córnea utilizado, não sendo capaz de minimizar ou maximizar os erros inerentes à contagem de células ou ao programa do microscópio especular de córnea no cálculo de área celular, coeficiente de variação e porcentagem de células endoteliais.

O programa Cells Analyzer PAT. REQ. demonstra o erro relativo referente ao tipo de amostra selecionada e calculada. Assim, exames realizados por qualquer marca e modelo de microscópio especular de córnea, em qualquer tempo passado, poderão ser submetidos ao programa e obter-se o erro amostral existente. Isto complementa a atual tecnologia dos microscópios especulares de córnea.

Alguns pontos negativos também foram evidenciados. Observou-se que embora o programa estatístico complemente o exame de microscopia especular de córnea, também o torna mais trabalhoso. Com os microscópios especulares de córnea disponíveis no mercado, o examinador necessita repetir o exame uma ou mais vezes (adquirindo duas ou mais imagens em locais distintos da córnea), para que consiga o tamanho de amostra adequado orientado pelo programa. Isto poderá gerar desconforto perante o

paciente e o examinador em razão da necessidade da repetição na aquisição de outra imagem diferente, sobretudo nos microscópios especulares de contato.

Pelo fato do programa Cells Analyzer PAT. REQ. não estar incorporado ao programa do microscópio especular de córnea, e sim a um outro microcomputador, o examinador necessita alimentar os dados obtidos no microscópio especular de córnea. Isso torna o exame mais complexo e demorado e também deve ser feito com cuidado e por examinador treinado, pois se houver qualquer erro, a análise será equivocada.

Todo processo de captura da imagem, contagem de células e análise estatística requer tempo para se contar muitas células e necessita da colaboração do paciente. A captura de mais de uma imagem limita a realização nos pacientes não colaborativos, como crianças e idosos.

Atualmente, com toda tecnologia disponível, sugerimos o modelo semiautomatizado com técnica de marcação dos centros celulares, como o usado neste estudo. Este método é mais trabalhoso e precisa de um examinador treinado para marcar os centros de todas as células, mas, assim evita-se o descarte de muitas células para análise e melhora a precisão do exame. Mas, novos estudos devem ser realizados para comparar dados endoteliais deste estudo com outros aparelhos disponíveis no mercado, com o emprego do programa Cells Analyzer PAT. REQ.

O exame ideal de microscopia especular de córnea seria realizado por um aparelho que captura imagem de todo endotélio com contagem do número absoluto de células endoteliais. Atualmente, como esta realidade

ainda não está disponível, a técnica sugerida é a obtenção de várias imagens endoteliais distintas tiradas de diferentes locais do mosaico endotelial central e paracentral e contagem de todas as células visíveis em cada imagem com análise estatística.

Assim, em condições clínicas semelhantes às do estudo, o número mínimo de células contadas para cada córnea, deverá ser ao redor de 400 células. Isso tornará o exame mais fidedigno e reprodutível.

O método contido no Cells Analyzer PAT. REQ. pode determinar o número necessário de células a serem incluídas em cada exame de microscópio especular de córnea, considerando a idade do paciente e o perfil de heterogeneidade da morfologia das células endoteliais priorizando o menor trabalho necessário para realização do exame fidedigno e reprodutível ao grau de confiança utilizado.

Novos estudos devem ser realizados para o conhecimento do tamanho da amostra endotelial nos exames de microscópio especular de córnea, considerando as diversas situações clínicas, cirúrgicas e científicas a que se aplicam tais meios semiológicos.

6 CONCLUSÕES

6.1 CONCLUSÕES GERAIS

Os valores de referência para a densidade endotelial foi $2.395,37 \pm 294,34$ cel/mm²; a área celular média foi $423,64 \pm 51,09$ μm²; o coeficiente de variação foi $0,40 \pm 0,04$ e a porcentagem de células hexagonais foi de $54,77 \pm 4,19\%$.

O percentual de células endoteliais desconsideradas no exame de microscopia especular ao se marcar 40 células foi 51,20%, ao se marcar 100 células, 35,70% e ao se marcar 150 células, 29,83%.

6.2 Conclusões Específicas

Nas condições deste estudo, o número teórico mínimo de células endoteliais a serem incluídas inicialmente no processo de amostragem endotelial do exame de microscopia especular de córnea, calculado pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ., foi $247,48 \pm 51,61$ e o número de células final executado sob orientação do programa Cells Analyzer PAT. REQ. foi $425,25 \pm 102,24$.

O erro amostral, calculado pelo programa Cells Analyzer PAT. REQ., no exame de microscopia especular ao serem marcadas 40 células foi $0,157 \pm 0,031$, ao serem marcadas 100 células foi $0,093 \pm 0,024$, ao serem

marcadas 150 foi $0,075 \pm 0,010$ e ao serem marcadas $425,25 \pm 102,24$ foi de $0,037 \pm 0,005$.

O programa Cells Analyzer PAT. REQ. não considerou nenhum dos exames amostralmente corretos seja com 40, 100 ou 150 células marcadas.

O programa Cells Analyzer PAT. REQ. considerou amostralmente corretos todos exames realizados, conforme rotina preconizada, em que $425,25 \pm 102,24$ células do processos amostrais, contendo entre duas e cinco imagens, foram contadas.

O aumento do número de células diminui a amplitude do intervalo de confiança para todas as variáveis endoteliais avaliadas pela microscopia especular de córnea: densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e porcentagem de células hexagonais.

7 ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação da Comissão de Ética para o projeto de pesquisa e termo de consentimento desta tese

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/08/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0342/08**, intitulado: **"ESTUDO DA REPRODUTIBILIDADE DO EXAME DE MICROSCOPIA ESPECULAR DE CÓRNEA EM AMOSTRAS ENDOTELIAIS COM DIFERENTE NÚMEROS DE CÉLULAS."** apresentado pelo Departamento de **OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Newton Kara José**

Pesquisador (a) Executante: **Ricardo Holzchuh**

CAPPesq, 07 de Agosto de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela
Comissão de Ética em Pesquisa (CAPPesq)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **ESTUDO DA REPRODUTIBILIDADE DO
EXAME DE MICROSCOPIA ESPECULAR DE CÔRNEA EM AMOSTRAS ENDOTELIAIS
COM DIFERENTE NÚMEROS DE CÉLULAS.**

PESQUISADOR : **PROF.DR. NEWTON KARA JOSÉ**

CARGO/FUNÇÃO: **Professor Titular** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **10792**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **12 meses**

1 – Desenho do estudo e objetivo(s).

A microscopia especular da córnea é um exame diagnóstico utilizado para avaliar a qualidade e a quantidade das células da camada mais interna da córnea, chamada de endotélio. É um exame de vital importância na prática clínica, principalmente nos pré-operatórios de cirurgias intra-oculares e seleção de córnea doadora para transplantes. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa determinar a vitalidade da córnea com base na análise das células do endotélio.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros.

Os pacientes serão examinados em um aparelho de microscopia especular de córnea de não contato, que é um microscópio específico para analisar por meio de fotos, as células de uma estrutura do olho, a córnea. O aparelho não entrará em contato com os olhos e não será necessário o uso de colírios ou outros medicamentos. O procedimento não é considerado experimental.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados.

Será realizado exame, dos olhos de biomicroscopia em um aparelho específico chamado lâmpada de fenda, antes do exame de microscopia especular.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3.

O desconforto é mínimo e não existe riscos. O procedimento é considerado não invasivo, sendo assim o aparelho não tocará no olho do paciente.

5 – Benefícios para o participante.

Proporciona a avaliação da vitalidade da córnea dos olhos, sendo de vital importância na prática clínica, principalmente nos pré-operatórios de cirurgias intra-oculares.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar.

Existem outros métodos de avaliar a vitalidade da córnea, como aparelhos que entram em contato com o olho, procedimento invasivo, necessário uso de colírio anestésico, demorado e de maior grau de dificuldade. O procedimento em questão tem a vantagem de ser prático, rápido, indolor e sem necessidade de usar colírios anestésicos.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são o **Prof. Dr. Newton Kara José** e **Dr. Ricardo Holzchuh** que pode ser encontrado no endereço **AMB-OFTALMOLOGIA**, Telefone **3069-6213**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"ESTUDO DA REPRODUTIBILIDADE DO EXAME DE MICROSCOPIA ESPECULAR DE CÓRNEA EM AMOSTRAS ENDOTELIAIS COM DIFERENTE NÚMEROS DE CÉLULAS"**.

Eu discuti com o Prof. Dr. Newton Kara José sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

8 REFERÊNCIAS

1. Kitzmann AS, Winter EJ, Nau CB, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Comparison of corneal endothelial cell images from a noncontact specular microscope and a scanning confocal microscope. *Cornea*. 2005 Nov;24(8):980-4.
2. McDermott ML, Atluri HKS. Corneal endothelium. In: Yanoff M, Duker JS, editors. *Ophthalmology*. 2nd ed. Philadelphia: Mosby; 2004. p. 422-35.
3. Nishida T. Cornea. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005. p. 3-26.
4. Phillips C, Laing R, Yee R. Cornea. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005. p. 3-26.
5. Phillips C, Laing R, Yee R. Specular microscopy. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005. p. 3-26.
6. Abib FC. *Microscopia especular de córnea- Manual e Atlas*. Rio de Janeiro: Rio Med Livros LTDA; 2000.
7. Abib FC. *Microscopia especular de córnea com validade estatística e reprodutibilidade*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2005.
8. Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, Bartels SP, Neufeld AH, Kenyon KR. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985 Apr;26(4):443-9.

-
9. Rao GN, Shaw EL, Arthur E, Aquavella JV. Morphological appearance of the healing corneal endothelium. *Arch Ophthalmol.* 1978 Nov;96(11):2027-30.
 10. Abib FC, Barreto Junior J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *J Cataract Refract Surg.* 2001 Oct;27(10):1574-8.
 11. Binder PS, Akers P, Zavala EY. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. *Ophthalmology.* 1979 Oct;86(10):1831-47.
 12. Cheng H, Jacobs PM, McPherson K, Noble MJ. Precision of cell density estimates and endothelial cell loss with age. *Arch Ophthalmol.* 1985 Oct;103(10):1478-81.
 13. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. II. Qualitative evaluation of corneal endothelial photomicrographs. *Arch Ophthalmol.* 1979 Sep;97(9):1720-5.
 14. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. *Arch Ophthalmol.* 1979 Sep;97(9):1714-9.
 15. Laing RA, Sanstrom MM, Berrospi AR, Leibowitz HM. Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res.* 1976 Jun;22(6):587-94.
 16. Benetz BA, Diaconu E, Bowlin SJ, Oak SS, Laing RA, Lass JH. Comparison of corneal endothelial image analysis by Konan SP8000 noncontact and Bio-Optics Bambi systems. *Cornea.* 1999 Jan;18(1):67-72.

17. Benetz BA, Gal RL, Ruedy KJ, Rice C, Beck RW, Kalajian AD, et al. Specular microscopy ancillary study methods for donor endothelial cell density determination of Cornea Donor Study images. *Curr Eye Res.* 2006 Apr;31(4):319-27.
18. Domingues FG, Moraes HV, Jr., Yamane R. Comparative study of the density of corneal endothelial cells after phacoemulsification by the "divide and conquer" and "quick chop" techniques. *Arq Bras Oftalmol.* 2005 Jan-Feb;68(1):109-15.
19. McCarey BE. Noncontact specular microscopy: a macrophotography technique and some endothelial cell findings. *Ophthalmology.* 1979 Oct;86(10):1848-60.
20. McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea.* 2008 Jan;27(1):1-16.
21. Tanimura K. A quantitative analysis of corneal endothelial cells. *Jpn J Ophthalmol.* 1981;32:1835-9.
22. Kreutziger GO. Lateral membrane morphology and gap junction structure in rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 1976 Sep;23(3):285-93.
23. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Arch Ophthalmol.* 1975 Feb;93(2):143-5.
24. Yee RW, Matsuda M, Edelhauser HF. Wide-field endothelial counting panels. *Am J Ophthalmol.* 1985 May 15;99(5):596-7.

-
25. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985 Jun;4(6):671-8.
 26. Maurice DM. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia.* 1968 Nov 15;24(11):1094-5.
 27. Edelhauser HF, Hanneken AM, Pederson HJ, Van Horn DL. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Arch Ophthalmol.* 1981 Jul;99(7):1281-7.
 28. Waring GO, 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology.* 1982 Jun;89(6):531-90.
 29. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *Ophthalmology.* 1982 Jun;89(6):525-30.
 30. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium-XXXVIII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol.* 1982 Jan;93(1):1-29.
 31. Binder HF, Binder RF. Regenerative processes in the endothelium of the cornea. *AMA Arch Ophthalmol.* 1957 Jan;57(1):11-3.
 32. Capella JA. Regeneration of endothelium in diseased and injured corneas. *Am J Ophthalmol.* 1972 Nov;74(5):810-7.
 33. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ. *Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 1977 Jul;16(7):597-613.

-
34. Laing RA, Neubauer L, Leibowitz HM, Oak SS. Coalescence of endothelial cells in the traumatized cornea. II. Clinical observations. *Arch Ophthalmol*. 1983 Nov;101(11):1712-5.
 35. Yee RW, Geroski DH, Matsuda M, Champeau EJ, Meyer LA, Edelhauser HF. Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function, and morphology in wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985 Sep;26(9):1191-201.
 36. Bourne WM, Kaufman HE. Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. *Am J Ophthalmol*. 1976 Mar;81(3):319-23.
 37. Laule A, Cable MK, Hoffman CE, Hanna C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol*. 1978 Nov;96(11):2031-5.
 38. Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Comparison of the corneal endothelium in an American and a Japanese population. *Arch Ophthalmol*. 1985 Jan;103(1):68-70.
 39. Vogt A. Die Sichtbarkeit des lebenden Hornhautendothels: Ein Beitrag zur Methodik der Spaltlampenmikroskopie. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1920;101(2-3):123-44.
 40. Modis L, Jr., Langenbucher A, Seitz B. Scanning-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. *Cornea*. 2001 Oct;20(7):711-4.
 41. Modis L, Jr., Langenbucher A, Seitz B. Corneal endothelial cell density and pachymetry measured by contact and noncontact specular microscopy. *J Cataract Refract Surg*. 2002 Oct;28(10):1763-9.

-
42. Modis L, Jr., Szalai E, Nemeth G, Berta A. Evaluation of a recently developed noncontact specular microscope in comparison with conventional pachymetry devices. *Eur J Ophthalmol*. 2010 Sep-Oct;20(5):831-8.
 43. Nichols JJ, Kosunick GM, Bullimore MA. Reliability of corneal thickness and endothelial cell density measures. *J Refract Surg*. 2003 May-Jun;19(3):344-52.
 44. Ogbuehi KC, Almubrad TM. Limits of agreement between the optical pachymeter and a noncontact specular microscope. *Cornea*. 2005 Jul;24(5):545-9.
 45. Ollivier FJ, Brooks DE, Komaromy AM, Kallberg ME, Andrew SE, Sapp HL, et al. Corneal thickness and endothelial cell density measured by non-contact specular microscopy and pachymetry in Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with laser-induced ocular hypertension. *Exp Eye Res*. 2003 Jun;76(6):671-7.
 46. Jurkunas U, Colby K. Evaluation of the Corneal Endothelium. *Techniques in Ophthalmology*. 2005;3(1):19-26.
 47. Landesz M, Kamps A, Slart R, Siertsema JV, van Rij G. Morphometric analysis of the corneal endothelium with three different specular microscopes. *Doc Ophthalmol*. 1995;90(1):15-28.
 48. Landesz M, Siertsema JV, Van Rij G. Comparative study of three semiautomated specular microscopes. *J Cataract Refract Surg*. 1995 Jul;21(4):409-16.
 49. Beltrame G, Salvetat ML, Driussi G, Chizzolini M. Effect of incision size and site on corneal endothelial changes in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg*. 2002 Jan;28(1):118-25.

-
50. Ravalico G, Botteri E, Baccara F. Long-term endothelial changes after implantation of anterior chamber intraocular lenses in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg*. 2003 Oct;29(10):1918-23.
 51. Ventura AC, Walti R, Bohnke M. Corneal thickness and endothelial density before and after cataract surgery. *Br J Ophthalmol*. 2001 Jan;85(1):18-20.
 52. Walkow T, Anders N, Klebe S. Endothelial cell loss after phacoemulsification: relation to preoperative and intraoperative parameters. *J Cataract Refract Surg*. 2000 May;26(5):727-32.
 53. Neubauer L, Laing RA, Leibowitz HM. Specular microscopic appearance of damaged and dead endothelial cells in corneas following short-term storage. *Arch Ophthalmol*. 1984 Mar;102(3):439-44.
 54. Lohman LE, Rao GN, Aquavella JA. Optics and clinical applications of wide-field specular microscopy. *Am J Ophthalmol*. 1981 Jul;92(1):43-8.
 55. Geroski DH, Edelhauser HF. Morphometric analysis of the corneal endothelium. Specular microscopy vs. alizarin red staining. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989 Feb;30(2):254-9.
 56. Doughty MJ. Concerning the symmetry of the 'hexagonal' cells of the corneal endothelium. *Exp Eye Res*. 1992 Jul;55(1):145-54.
 57. Dick HB, Kohnen T, Jacobi FK, Jacobi KW. Long-term endothelial cell loss following phacoemulsification through a temporal clear corneal incision. *J Cataract Refract Surg*. 1996 Jan-Feb;22(1):63-71.

-
58. Larsson LI, Bourne WM, Pach JM, Brubaker RF. Structure and function of the corneal endothelium in diabetes mellitus type I and type II. *Arch Ophthalmol*. 1996 Jan;114(1):9-14.
 59. Alves EAF. *Efeito da Lidocaína a 1% sem preservativo sobre o endotélio corneano de coelhos*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.
 60. Ohno K, Nelson LR, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Comparison of recording systems and analysis methods in specular microscopy. *Cornea*. 1999 Jul;18(4):416-23.
 61. Schor P, Chamon W. Microscopia especular de córnea. *Arq Bras Oftalmol*. 1996;59(5):529-31.
 62. Siertsema JV, Landes M, van den Brom H, van Rij G. Automated video image morphometry of the corneal endothelium. *Doc Ophthalmol*. 1993;85(1):35-44.
 63. Vecchi M, Braccio L, Orsoni JG. The Topcon SP 1000 and Image-NET systems. A comparison of four methods for evaluating corneal endothelial cell density. *Cornea*. 1996 May;15(3):271-7.
 64. Doughty MJ. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: a review of techniques and their application. *Optom Vis Sci*. 1989 Sep;66(9):626-42.
 65. Doughty MJ. Could the coefficient of variation (COV) of the corneal endothelium be overestimated when a centre-dot method is used? *Clin Exp Optom*. 2008 Jan;91(1):103-10.

-
66. Doughty MJ, Aakre BM. Further analysis of assessments of the coefficient of variation of corneal endothelial cell areas from specular microscopic images. *Clin Exp Optom*. 2008 Sep;91(5):438-46.
 67. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997 Mar;38(3):779-82.
 68. Diaz-Valle D, Benitez del Castillo Sanchez JM, Castillo A, Sayagues O, Moriche M. Endothelial damage with cataract surgery techniques. *J Cataract Refract Surg*. 1998 Jul;24(7):951-5.
 69. Doughty MJ, Aakre BM, Ystenaes AE, Svarverud E. Short-term adaptation of the human corneal endothelium to continuous wear of silicone hydrogel (lotrafilcon A) contact lenses after daily hydrogel lens wear. *Optom Vis Sci*. 2005 Jun;82(6):473-80.
 70. Esgin H, Erda N. Endothelial cell density of the cornea during rigid gas permeable contact lens wear. *Claeo J*. 2000 Jul;26(3):146-50.
 71. Doughty MJ, Oblak E. A comparison of two methods for estimating polymegethism in cell areas of the human corneal endothelium. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2008 Jan;28(1):47-56.
 72. Alanko HI, Airaksinen PJ. A counter for fixed-frame endothelial cell analysis. *Am J Ophthalmol*. 1981 Mar;91(3):401-3.
 73. Hirst LW, Ferris FL, 3rd, Stark WJ, Fleishman JA. Clinical specular microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1980 Jan;19(1):2-4.

-
74. Guell JL, Morral M, Gris O, Gaytan J, Sisquella M, Manero F. Five-year follow-up of 399 phakic Artisan-Verisyse implantation for myopia, hyperopia, and/or astigmatism. *Ophthalmology*. 2008 Jun;115(6):1002-12.
 75. Inoue K, Kimura C, Amano S, Oshika T, Tsuru T. Corneal endothelial cell changes twenty years after penetrating keratoplasty. *Jpn J Ophthalmol*. 2002 Mar-Apr;46(2):189-92.
 76. Inoue K, Tokuda Y, Inoue Y, Amano S, Oshika T, Inoue J. Corneal endothelial cell morphology in patients undergoing cataract surgery. *Cornea*. 2002 May;21(4):360-3.
 77. Kramann C, Pitz S, Schwenn O, Haber M, Hommel G, Pfeiffer N. Effects of intraocular cefotaxime on the human corneal endothelium. *J Cataract Refract Surg*. 2001 Feb;27(2):250-5.
 78. Lackner B, Pieh S, Schmidinger G, Simader C, Franz C, Dejaco-Ruhswurm I, et al. Long-term results of implantation of phakic posterior chamber intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg*. 2004 Nov;30(11):2269-76.
 79. Lundberg B, Jonsson M, Behndig A. Postoperative corneal swelling correlates strongly to corneal endothelial cell loss after phacoemulsification cataract surgery. *Am J Ophthalmol*. 2005 Jun;139(6):1035-41.
 80. Maar N, Graebe A, Schild G, Stur M, Amon M. Influence of viscoelastic substances used in cataract surgery on corneal metabolism and endothelial morphology: comparison of Healon and Viscoat. *J Cataract Refract Surg*. 2001 Nov;27(11):1756-61.

-
81. Morikubo S, Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S, Akagi Y. Corneal changes after small-incision cataract surgery in patients with diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol*. 2004 Jul;122(7):966-9.
 82. Oliveira F, Oliveira Motta AC, Muccioli C. Corneal specular microscopy in infectious and noninfectious uveitis. *Arq Bras Oftalmol*. 2009 Jul-Aug;72(4):457-61.
 83. Tan DT, Chee SP, Lim L, Theng J, Van Ede M. Randomized clinical trial of Surodex steroid drug delivery system for cataract surgery: anterior versus posterior placement of two Surodex in the eye. *Ophthalmology*. 2001 Dec;108(12):2172-81.
 84. Wirbelauer C, Wollensak G, Pham DT. Influence of cataract surgery on corneal endothelial cell density estimation. *Cornea*. 2005 Mar;24(2):135-40.
 85. Summary of safety and effectiveness data. Department of Health & Human Services- Food and Drug Administration (FDA); 1999.
 86. van Schaick W, van Dooren BT, Mulder PG, Volker-Dieben HJ. Validity of endothelial cell analysis methods and recommendations for calibration in Topcon SP-2000P specular microscopy. *Cornea*. 2005 Jul;24(5):538-44.
 87. Abib FC, Holzchuh R, Hida RY, Holzchuh N. A proposal for indices of reliability for endothelial exams with specular microscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51. E-Abstract 5670. (Presented at The Association for Research in Vision and Ophthalmology -ARVO; 2010; Fortlauderdale, FL, EUA)

-
88. Abib FC, Holzchuh R, Schaefer A, Schaefer T, Godói R. The endothelial sample size analysis in corneal specular microscopy clinical exams. *Cornea*. In press 2011.
 89. Hida RY, Holzchuh N, Kara-Jose N, Holzchuh R. Reliability of endothelial specular microscope based on the number of counted cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50. E-Abstract 5781. (Presented at The Association for Research in Vision and Ophthalmology -ARVO; 2009; Fortlauderdale, FL, EUA)
 90. Holzchuh R, Hida RY, Yamakami IM, Holzchuh N, Abib FC, Kara-José N. Sampling error analysis of corneal specular microscopy in cataract patients. *Arq Bras Oftalmol*. In press 2011.
 91. Holzchuh R, Holzchuh N, Hida RY, Abib FC. Cells Analyzer – Clinical statistical lab to determine corneal endothelial cells sample size and age control analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(E-Abstract 1357). (Presented at The Association for Research in Vision and Ophthalmology -ARVO; 2006; Fortlauderdale, FL, EUA)
 92. Melo CM, Santos PM, Santos RC, Abib FC. Using of Cells Analyser software in the study of image of corneal specular microscope endothelial samples. *Arq Bras Oftalmol*. 2008 Jan-Feb;71(1):79-82.
 93. Abib FC, Schaefer ARC, Schaefer TMC, Godois R, Laing R. Corneal endothelial cell sample profile on specular microscopy with reliability and reproducibility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48. E-Abstract 4286. (Presented at The Association for Research in Vision and Ophthalmology -ARVO; 2007; Fortlauderdale, FL, EUA)

-
94. Laing RA, Abib FC. Corneal endothelium cell analysis, past, present and future. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48. E-Abstract 2706. (Presented at The Association for Research in Vision and Ophthalmology -ARVO; 2007; Fortlauderdale, FL, EUA)
 95. Schaefer ARC, Abib FC, Schaefer TMC, Holzchuh R, Godois R. Corneal endothelial cell sample size of specular microscopy with three different statistical power - a critical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48. E-Abstract 2705. (Presented at The Association for Research in Vision and Ophthalmology -ARVO; 2007; Fortlauderdale, FL, EUA)
 96. Vajpayee RB, Verma K, Sinha R, Titiyal JS, Pandey RM, Sharma N. Comparative evaluation of efficacy and safety of ophthalmic viscosurgical devices in phacoemulsification [ISRCTN34957881]. *BMC Ophthalmol.* 2005;5:17.
 97. Pereira AC, Porfirio F, Jr., Freitas LL, Belfort R, Jr. Ultrasound energy and endothelial cell loss with stop-and-chop and nuclear preslice phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg.* 2006 Oct;32(10):1661-6.
 98. Chuang LH, Yeung L, Ku WC, Yang KJ, Lai CC. Safety and efficacy of topical anesthesia combined with a lower concentration of intracameral lidocaine in phacoemulsification: paired human eye study. *J Cataract Refract Surg.* 2007 Feb;33(2):293-6.
 99. Mathys KC, Cohen KL, Armstrong BD. Determining factors for corneal endothelial cell loss by using bimanual microincision phacoemulsification and power modulation. *Cornea.* 2007 Oct;26(9):1049-55.

-
100. Suzuki H, Oki K, Takahashi K, Shiwa T, Takahashi H. Functional evaluation of corneal endothelium by combined measurement of corneal volume alteration and cell density after phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg*. 2007 Dec;33(12):2077-82.
 101. Adina B. The influence of viscoelastic substances on the corneal endothelium during cataract surgery by phacoemulsification. *Oftalmologia*. 2008;52(1):84-9.
 102. Sturrock GD, Sherrard ES, Rice NS. Specular microscopy of the corneal endothelium. *Br J Ophthalmol*. 1978 Dec;62(12):809-14.
 103. Sugar A. Clinical specular microscopy. *Surv Ophthalmol*. 1979 Jul-Aug;24(1):21-32.
 104. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye (Lond)*. 2003 Nov;17(8):912-8.
 105. Erickson P, Doughty MJ, Comstock TL, Cullen AP. Endothelial cell density and contact lens-induced corneal swelling. *Cornea*. 1998 Mar;17(2):152-7.
 106. Hiraoka T, Furuya A, Matsumoto Y, Okamoto F, Kakita T, Oshika T. Influence of overnight orthokeratology on corneal endothelium. *Cornea*. 2004 Nov;23(8 Suppl):S82-6.
 107. Sheng H, Parker EJ, Bullimore MA. An evaluation of the ConfoScan3 for corneal endothelial morphology analysis. *Optom Vis Sci*. 2007 Sep;84(9):888-95.
 108. Smith GT, Mireskandari K, Pullum KW. Corneal swelling with overnight wear of scleral contact lenses. *Cornea*. 2004 Jan;23(1):29-34.

-
109. Wiffen SJ, Hodge DO, Bourne WM. The effect of contact lens wear on the central and peripheral corneal endothelium. *Cornea*. 2000 Jan;19(1):47-51.
 110. van Dooren BT, Mulder PG, Nieuwendaal CP, Beekhuis WH, Melles GR. Endothelial cell density after deep anterior lamellar keratoplasty (Melles technique). *Am J Ophthalmol*. 2004 Mar;137(3):397-400.
 111. Van Dooren B, Mulder PG, Nieuwendaal CP, Beekhuis WH, Melles GR. Endothelial cell density after posterior lamellar keratoplasty (Melles techniques): 3 years follow-up. *Am J Ophthalmol*. 2004 Aug;138(2):211-7.
 112. Lass JH, Gal RL, Dontchev M, Beck RW, Kollman C, Dunn SP, et al. Donor age and corneal endothelial cell loss 5 years after successful corneal transplantation. Specular microscopy ancillary study results. *Ophthalmology*. 2008 Apr;115(4):627-32 e8.
 113. Harper CL, Boulton ME, Marcyniuk B, Tullo AB, Ridgway AE. Endothelial viability of organ-cultured corneas following penetrating keratoplasty. *Eye (Lond)*. 1998;12 (Pt 5):834-8.
 114. Bourne WM, Doughman DJ, Lindstrom RL, Kolb MJ, Mindrup E, Skelnik D. Increased endothelial cell loss after transplantation of corneas preserved by a modified organ-culture technique. *Ophthalmology*. 1984 Mar;91(3):285-9.
 115. Bourne WM. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea*. 2001 Aug;20(6):560-9.
 116. Borderie VM, Werthel AL, Touzeau O, Allouch C, Boutboul S, Laroche L. Comparison of techniques used for removing the recipient stroma in anterior lamellar keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 2008 Jan;126(1):31-7.

-
117. Doughty MJ, Muller A, Zaman ML. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. *Cornea*. 2000 Mar;19(2):148-58.
 118. Barbetta PA. *Estatística Aplicada às Ciências Sociais*. 5ª ed. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.
 119. Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. *Bioestatística*. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda; 1981.
 120. Callegari-Jacques SM. *Bioestatística- Princípios e Aplicações*. Porto Alegre: Artmed Editora S.A.; 2003.
 121. Doria Filho U. *Introdução à Bioestatística para Simples Mortais*. São Paulo: Elsevier Editora Ltda; 2003.
 122. Hirst LW, Auer C, Abbey H, Cohn J, Kues H. Quantitative analysis of wide-field endothelial specular photomicrographs. *Am J Ophthalmol*. 1984 Apr;97(4):488-95.
 123. Hirst LW, Yamauchi K, Enger C, Vogelpohl W, Whittington V. Quantitative analysis of wide-field specular microscopy. II. Precision of sampling from the central corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989 Sep;30(9):1972-9.
 124. Bovel R, Kaufman SC, Thompson HW, Hamano H. Corneal thickness measurements with the Topcon SP-2000P specular microscope and an ultrasound pachymeter. *Arch Ophthalmol*. 1999 Jul;117(7):868-70.

-
125. Cheung SW, Cho P. Endothelial cells analysis with the TOPCON specular microscope SP-2000P and IMAGEnet system. *Curr Eye Res.* 2000 Oct;21(4):788-98.
 126. de Sanctis U, Machetta F, Razzano L, Dalmaso P, Grignolo FM. Corneal endothelium evaluation with 2 noncontact specular microscopes and their semiautomated methods of analysis. *Cornea.* 2006 Jun;25(5):501-6.
 127. Inaba M, Matsuda M, Shiozaki Y, Kosaki H. Regional specular microscopy of endothelial cell loss after intracapsular cataract extraction: a preliminary report. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1985 Apr;63(2):232-5.
 128. Amann J, Holley GP, Lee SB, Edelhauser HF. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol.* 2003 May;135(5):584-90.
 129. Claerhout I, Beele H, Van den Abeele K, Kestelyn P. Therapeutic penetrating keratoplasty: clinical outcome and evolution of endothelial cell density. *Cornea.* 2002 Oct;21(7):637-42.
 130. Davanger M, Olsen EG. A new method of determining the cell density from a corneal specular micrograph. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1984 Dec;62(6):919-22.
 131. Guigou S, Coste R, Denis D. Central corneal thickness and endothelial cell density in congenital glaucoma. *J Fr Ophtalmol.* 2008 May;31(5):509-14.
 132. Nucci P, Brancato R, Mets MB, Shevell SK. Normal endothelial cell density range in childhood. *Arch Ophthalmol.* 1990 Feb;108(2):247-8.

-
133. Olsen T. Optical principles for estimation of endothelial cell density with the non-contact specular microscope. *Acta Ophthalmol* (Copenh). 1979 Oct;57(5):860-7.
 134. Padilla MD, Sibayan SA, Gonzales CS. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Filipino eyes. *Cornea*. 2004 Mar;23(2):129-35.
 135. Snellingsen T, Rao GN, Shrestha JK, Huq F, Cheng H. Quantitative and morphological characteristics of the human corneal endothelium in relation to age, gender, and ethnicity in cataract populations of South Asia. *Cornea*. 2001 Jan;20(1):55-8.