

**Cinthia Mendonça de Melo**

**ESTUDO DAS AMOSTRAS ENDOTELIAIS DE  
MICROSCOPIA ESPECULAR DE CÓRNEA**

**BRASÍLIA - 2007**

**Cinthia Mendonça de Melo**

# **ESTUDO DAS AMOSTRAS ENDOTELIAIS DE MICROSCOPIA ESPECULAR DE CÓRNEA**

Tese apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor, área de Concentração: Oftalmologia.

**Orientador: Prof. Dr. Procópio Miguel dos Santos**

**Co-orientador: Prof. Dr. Fernando César Abib**

**Brasília - 2007**

**Melo, Cinthia Mendonça de**  
**Estudo das amostras endoteliais de microscopia especular de córnea /**  
**Cinthia Mendonça de Melo – Brasília - 2007**  
**xvii, 89 p.**

**Tese (Doutorado). Oftalmologia. Faculdade de Ciências da Saúde da**  
**UnB**

**1. Endotélio da córnea 2. Microscopia especular 3. Análise estatística.**

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes nos grupos 1 e 2 de acordo com estado endotelial (Brasília; 2006)

Gráfico 2 - Distribuição dos exames de acordo com o número de imagens necessárias para validar o exame (Brasília, 2006)

Gráfico 3 - Número de células na primeira imagem e na amostra total validados com 1, 2, 3, 4 imagens (Goiânia, 2006)

Gráfico 4 - Média do número de células contadas nas amostras endoteliais, nos grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)

Gráfico 5 - Área média das amostras endoteliais nos grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)

Gráfico 6 - Erro amostral entre os grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)

Gráfico 7 - Média do número de células contadas nas amostras endoteliais, nos grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)

Gráfico 8 - Área média das amostras endoteliais nos grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)

Gráfico 09 - Erro amostral entre os grupos 2 A e 2 B (Goiânia, 2006)

Gráfico 10 - Média do número de células contadas nas amostras endoteliais, nos grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)

Gráfico 11 - Área média das amostras endoteliais nos grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)

Gráfico 12 - Erro amostral entre os grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006).

**TERMO DE APROVAÇÃO  
CINTHIA MENDONÇA DE MELO**

**ESTUDO DAS AMOSTRAS ENDOTELIAIS DE  
MICROSCOPIA ESPECULAR DE CÓRNEA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor, no curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, em 15 de Junho de 2007, pela comissão formada pelos seguintes professores:

Orientador: Prof. Dr. Procópio Miguel dos Santos  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UNB)  
Faculdade de Medicina do Distrito Federal (FEPECS)

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando César Abib  
Faculdade de Medicina do Estado do Paraná (UFPR)

Prof<sup>a</sup> Dra. Regina Cândido Ribeiro dos Santos  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UNB)  
Faculdade de Medicina do Distrito Federal (FEPECS)

Prof. Dr. João Jorge Nassaralla  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UNB)

Prof. Dr. Nilo Holzchuh  
Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

Prof. Dr. José Álvaro Pereira Gomes  
Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Prof. Livre Docente Milton Ruiz Alves  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP)  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas  
(UNICAMP)

**“Bendito o homem que confia no SENHOR e cuja esperança é o SENHOR. Porque ele é como a árvore plantada junto às águas, que estende as suas raízes para o ribeiro e não receia quando vem o calor, mas a sua folha fica verde; e no ano de sequeidão, não se perturba, nem deixa de dar fruto”.**

**Jeremias 17: 7-8.**

**Aos meus pais João Carlos e Ione; ao meu  
marido Juliano, pela compreensão, apoio  
e amor.**

Ao Prof. Dr. Fernando César Abib, por toda a dedicação, orientação, prontidão e exemplo, na realização do atual estudo.

Ao Prof. Dr. Procópio Miguel dos Santos, pela orientação, apoio e permanente estímulo.

Ao meu pai Dr. João Carlos Rodrigues de Melo, incentivador primeiro deste projeto e exemplo de vida e dedicação no estudo da oftalmologia.

Aos Colegas do Instituto Panamericano da Visão, por uma convivência frutífera.

Ao Serviço de Medicina Especializada do Laboratório de Microscopia Especular de córnea da Universidade do Paraná.

À Universidade de Brasília e aos seus professores, em especial, aos professores da Pós-Graduação, Prof<sup>a</sup> Dra. Rosicler Rosa Aiza Alvarez, Prof. Dr. Edgar Merchán Hamann, pela oportunidade de realizar este projeto e pela orientação técnica durante nossa formação.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz, coordenador e professor do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, pelo exemplo de simplicidade.

Às secretárias da Pós-Graduação, Sra. Edigrês Alves de Sousa e Srta. Silvia Aparecida Ferreira Costa, sempre prestativas e carinhosas no zelo normativo da Instituição.

À secretária do centro de estudos do Instituto Panamericano da Visão, **Suzy xxxxxxxx**, pela observância das anotações e auxílio administrativo do projeto.

A todos que não mencionei, mas que, direta ou indiretamente, colaboraram no desenvolvimento desse trabalho.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos .....	vi
Lista de Ilustrações.....	x
Lista de Tabelas e Gráficos.....	xii
Lista de Anexos.....	
Abreviaturas, Símbolos e Vocabulários.....	xiv
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 – Hipóteses.....	4
1.2 – Relevância do Estudo.....	4
2. OBJETIVOS.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1 Anatomia da Córnea.....	9
3.2 Endotélio.....	10
3.2.1 Histologia.....	10
3.2.2 Fisiologia.....	10
3.2.3 Regeneração endotelial.....	12
3.2.4 Alterações decorrentes da idade.....	13
3.2.5 Semiologia endotelial .....	14
3.3 Microscopia Especular.....	16
3.3.1 Princípio físico.....	16
3.3.2 Cronologia do desenvolvimento da MEC.....	17

3.3.3 Classificação dos Microscópios especulares.....	19
3.3.4 Softwares de para análise das imagens endoteliais.....	21
3.3.5 Análise crítica do atual estado da microscopia especular.....	24
3.3.6 Software para determinação do erro amostral e do tamanho da amostragem endotelial.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 - Caracterização e população do estudo.....	27
4.2 - Apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	27
4.3 - Material.....	28
4.3.1 - Seleção da amostra.....	28
4.3.2 - Critérios de inclusão e exclusão.....	28
4.4 – Métodos.....	29
4.4.1 - Caracterização da amostra.....	29
4.4.2 - Microscopia especular de córnea.....	29
4.4.3 - Técnica utilizada para a captação das imagens endoteliais.....	29
4.4.4 - Captura da Amostragem Endotelial.....	30
4.4.5 - Marcação das células endoteliais.....	31
4.4.6 - Avaliação das imagens endoteliais pelo software <i>Bambi 2000 Plus®</i> .....	32
4.4.7 - Utilização do <i>Cells Analyzer</i> <small>PAT. REC</small> para análise das amostras endoteliais.....	33
4.4.8 - Interpretação do erro amostral na primeira imagem.....	35
4.4.9 - Aumento da amostragem endotelial nos exames com número de células insuficientes.....	36
4.4.10 - Dados amostrais calculados pelo <i>Cells Analyzer</i> <small>PAT. REC</small> .....	37

4.4.11 - Dados da semiologia endotelial calculados pelo <i>Cells Analyzer</i> PAT. REC.....	38
4.5. Caracterização dos grupos.....	39
4.6. Apresentação dos dados amostrais dos exames endoteliais.....	40
4.7. Comparações realizadas com dados amostrais e metodologia.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1- Caracterização da amostra.....	43
5.2- Demonstração do tamanho das amostras endoteliais para obtenção de validade estatística.....	46
5.3- Dados amostrais representativos dos grupos estudados.....	50
5.4- Comparações realizadas dos dados amostrais.....	54
6 - DISCUSSÃO.....	66
6.1-Metodologia.....	67
6.2-Microscopia Especular de Córnea.....	70
7 - CONCLUSÕES.....	77
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
9 - ANEXOS.....	85

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 640 X: Endotélio e membrana de Descemet normais. (Fonte: ABIB, 2000)

Figura 2: 2 A: Representação gráfica da reflexão especular do raio luminoso incidente sobre a superfície endotelial; 2 B: Imagem de microscopia especular do endotélio normal. (Fonte: Phillips et al., 2004)

Figura 3: Desenho esquemático de corte longitudinal do globo ocular evidenciando a córnea. (Fonte: Kanski J, 2002)

Figura 4: Corte histológico demonstrando as camadas da córnea. (Fonte:-----)

Figura 5: Edema corneal por descompensação e falência endotelial. (Fonte: Foto da autora)

Figura 6: Foto de microscopia especular: 6 A: paciente com 17 anos, com endotélio regular, 6 B paciente de 82 anos com alteração no formato e tamanho das células. (Fonte: Abib, 2006)

Figura 7: Reflexão em uma superfície entre dois meios transparentes. Reflexão especular: ângulo do raio incidente ( $\theta_1$ ) é igual ao ângulo do raio refletido ( $\theta'_1$ ); o ângulo de refração ( $\theta_2$ ) depende dos índices refrativos dos meios. (Fonte: ABIB, 2000)

Figura 8: Microscópio especular de não-contato NONCON ROBO-CA SP-8000®. (Fonte: Foto da autora)

Figura 9: Desenho esquemático do método de análise do retículo fixo: somente as células dentro do retículo retângulo serão contadas. (Fonte: PHILLIPS et al., 2005)

Figura 10: Avaliação da densidade endotelial pelo método de marcação dos centros celulares realizada pelo Bambi 2000 Plus®. (Fonte: ABIB, 2006)

Figura 11: Desenho esquemático do método de análise do retículo móvel: as bordas de um grupo de células são circundadas. (Fonte: PHILLIPS et al., 2005)

Figura 12: Microscópio especular de contato *Bio-Optics® LSM 2000C*. (Fonte: foto da autora)

Figura 13: Tela do software *Bambi 2000 Plus* após a captação da imagem pelo microscópio especular. (Fonte: Foto da autora)

Figura 14: Tela fornecida pelo software *Bambi 2000 plus*, demonstrando a marcação dos centros celulares. (Fonte: Foto da autora)

Figura 15: Laudo fornecido pelo software *Bambi 2000 plus®*, demonstrando os dados semiológicos calculados. (Fonte: Foto da autora)

Figura 16: Tela fornecida pelo software *Cells Analyzer PAT. REC.*, demonstrando a escolha do grau de confiança. (Fonte: Foto da autora)

Figura 17: Tela fornecida pelo software *Cells Analyzer PAT. REC.*, demonstrando a inserção dos dados de identificação do paciente. (Fonte: Foto da autora)

Figura 18: Tela fornecida pelo software *Cells Analyzer PAT. REC.*, demonstrando a inserção dos dados semiológicos da imagem endotelial avaliada pela microscopia especular. (Fonte: Foto da autora)

Figura 19: Tela fornecida pelo software *Cells Analyzer PAT. REC.*, demonstrando que o erro relativo calculado foi maior que o erro relativo planejado. (Fonte: Foto da autora)

Figura 20: Tela fornecida pelo software *Cells Analyzer PAT. REC.*, demonstrando a inserção de novas imagens. (Fonte: Foto da autora)

Figura 21: Tela fornecida pelo software *Cells Analyzer PAT. REC.*, demonstrando os dados semiológicos do exame composto por três imagens endoteliais e respectiva análise amostral estatística. (Fonte: Foto da autora)

Figura 22: Laudo fornecido pelo software *Cells analyzer PAT. REC.* (Fonte: Foto da autora)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição e freqüência dos pacientes por indicação do exame de microscopia especular de córnea (Brasília; 2006)

Tabela 2 - Dados semiológicos da primeira imagem dos exames da amostra total (Brasília, 2006)

Tabela 3 - Distribuição dos exames de acordo com o número de imagens necessárias para validar o exame (Brasília, 2006)

Tabela 4 - Freqüência dos pacientes por indicação do exame de microscopia especular de córnea (Brasília; 2006)

Tabela 5 - Número de casos e células na primeira imagem e na amostra total validados com 1, 2, 3, 4 imagens (Brasília, 2006)

Tabela 6 - Dados amostras dos exames concluídos com uma imagem endotelial (Brasília, 2006)

Tabela 7 - Dados amostras dos exames concluídos no grupo 2 A (Brasília, 2006)

Tabela 8 - Dados amostras dos exames concluídos no grupo 2 B (Goiânia, 2006)

Tabela 9 - Análise estatística do número de células consideradas entre os grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)

Tabela 10 - Análise estatística da área das amostras endoteliais consideradas entre os grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)

Tabela 11 - Análise estatística do erro amostral entre os grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)

Tabela 12 - Análise estatística do número de células consideradas entre os grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)

Tabela 13 - Análise estatística da área das amostras endoteliais consideradas entre os grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)

Tabela 14 - Análise estatística do erro amostral entre os grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)

Tabela 15 - Análise estatística do número de células consideradas entre os grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)

Tabela 16 - Análise estatística da área das amostras endoteliais consideradas entre os grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)

Tabela 17 - Análise estatística do erro amostral entre os grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E VOCÁBULOS

AAO – Academia Americana de Oftalmologia  
Apud – citado por, em  
ARVO – Association for Research in Vision and Ophthalmology  
B-D – Becton & Dickinson  
BSS – Solução salina balanceada  
CA – câmara anterior  
CL – cloro  
cm - centímetro  
CV – coeficiente de variação  
Diam. – diâmetro  
d.p. – desvio-padrão  
et al. – e outros  
FIG. – figura  
g – grama  
GRAF. – gráfico  
h – hora (s)  
HÁ – humor aquoso  
Kg – quilograma  
l – litro  
Laser – Light Amplified by Stimulated Emission of Radiation  
M – molar  
MEC – microscopia especular de córnea  
MEV – microscopia eletrônica de varredura  
 $\mu\text{m}^2$  - micra quadrada  
 $\text{mm}^2$  - milímetro quadrado  
MO – microscopia óptica  
n – número  
Na – sódio  
OD – olho direito  
OE – olho esquerdo  
p – probabilidade  
UFP – Universidade Federal do Paraná  
x – vezes  
 $\mu$  - micron  
% - por cento  
< - menor que  
    > - maior que  
    = - igual  
    & - e

## RESUMO

**Objetivo:** Determinar se existe diferença entre os resultados da semiologia endotelial corneal, empregada na microscopia especular, que considera a amostra endotelial contida em uma única imagem, e a obtida quando a amostragem é orientada por software específico, em tantas imagens e células quanto indicadas por este software.

**Métodos:** Foi realizado um estudo transversal, comparando as amostras endoteliais com e sem a intervenção do software. A amostra foi composta de 298 olhos de 149 pacientes, divididos em dois grupos: Grupo 1: composto pelos dados amostrais dos exames considerados corretos pelo software Cells Analyzer *PAT. REC* com 1 imagens e Grupo 2 que foi subdividido em 2 grupos- Grupo 2 A: composto pelos dados amostrais da primeira imagem dos exames considerados incorretos pelo software Cells Analyzer *PAT. REC*; e - Grupo 2 B: composto pelos dados amostrais dos exames que consideram tantas imagens quantas necessárias para que o exame seja considerado completo pela análise do software Cells Analyzer *PAT. REC*. Foram realizadas três tipos de comparação : comparação 1: Grupo 1 X Grupo 2 A; comparação 2- Grupo 2 A X Grupo 2 B e comparação 3 - Grupo 1 X Grupo 2 B.

**Resultados:** As três comparações demonstraram que os grupos apresentam perfis amostrais distintos, porém, dentro dos grupos estudados - Grupo 1, Grupo 2 A e Grupo 2 B - existe um perfil de homogeneidade amostral evidenciado pelo resultado da análise estatística empregada a partir de dados amostrais calculados pelo Cells Analyzer *PAT. REC* na amostra composta pelos 298 exames endoteliais estudados.

**Conclusão:** O estudo dos dados amostrais sem e com a intervenção do software *Cells Analyser PAT. REC* se mostrou estatisticamente diferente, com amostras maiores e erros amostrais menores, o que evidencia a importância do seu uso para se obter exames de microscopia especular de córnea com representatibilidade, padronização e reprodutibilidade.

## ABSTRACT

**Purpose:** To describe differences among number of cells, evaluated endothelial area and relative error comparing endothelial samples from one endothelial image with endothelial samples obtained from guidance of a specific software, with number of cells and images as many as necessary.

**Methods:** A transversal study was performed, comparing the endothelial samples with and without intervention of the software. The sample consisted of 298 eyes of 149 individuals. The sample was divided in two groups: group 1: data from 141 eyes considered correct with one image; group 2: in 157 eyes was necessary to get more than one image for the sample be admitted as correct; the group 2 was further divided into two subgroups: 2.A: the data of the first image and group 2. B: data of complete sample. Three comparisons were performed: comparison 1: Group 1 x Group 2 A; comparison 2: 2A X 2 B and comparison 3: Group A X group 2. B.

**Results:** The statistic comparisons of sample's data (number of counting cells, evaluate field, and relative error) of the Group 1 X group 2 A, Groups 2 A X 2 B and Group A X group 2 B; showed that groups had different sample.

**Conclusion:** The study of sample's data with or without the analysis of the software *Cells Analyzer PAT. REC* showed statistically significant differences showing clearly the importance of using it in order to obtain representative, standardized and reproducible specular microscopy exam.

## **1 INTRODUÇÃO**

O endotélio corneal é formado por uma camada única de células hexagonais aderidas à membrana de Descemet, que reveste posteriormente a córnea. Tem as funções de barreira à entrada de fluidos e de bomba ativa para transporte de íons e água para a câmara anterior, mantendo a transparência corneal, ou seja, prevenindo o edema corneal, que pode levar a baixa da visão. (Abib, 2000; Krachmer et al., 2005) (Figura 1)

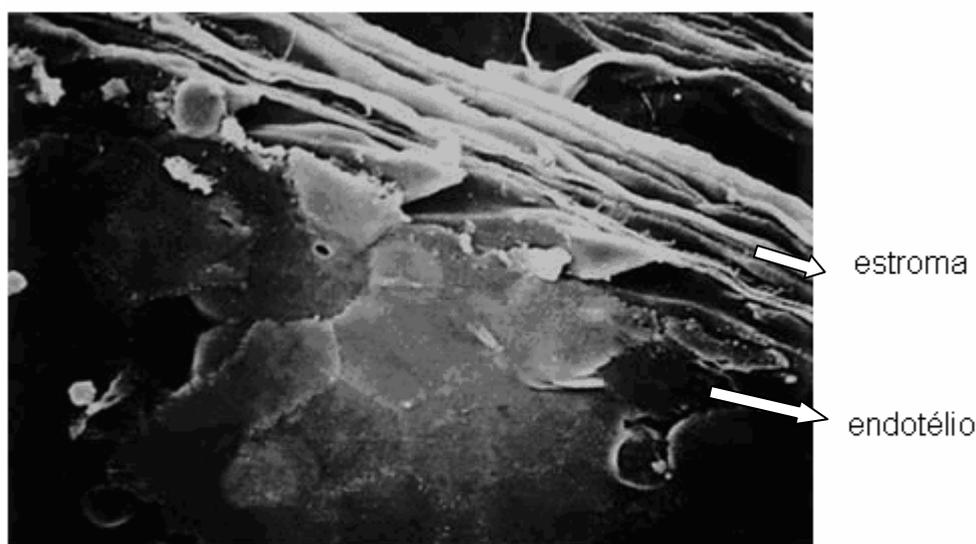


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 640 X: endotélio e membrana de Descemet normais. (Fonte: Abib, 2006)

A avaliação e o estudo do endotélio corneal na clínica oftalmológica são realizados principalmente pela microscopia especular, introduzidos por Maurice em 1968. A partir daí, outros microscópios especulares de contato e de não-contato foram desenvolvidos para estudo do endotélio corneal *in vivo*. Como o endotélio corneal é considerado amitótico, o desenvolvimento dessa nova técnica proporcionou a avaliação da sua vitalidade: com a idade, após cirurgias intra-oculares, nos usuários de lentes de contato, promovendo grande avanço no estudo morfológico do endotélio. (Maurice, 1968; Landes et al., 1995)

A microscopia especular é uma técnica não invasiva, de fácil realização, baseada na reflexão de um feixe luminoso incidente sobre a superfície do endotélio corneano, em que parte reflete de forma especular, e é captado pelo microscópio especular, que apresenta a imagem endotelial magnificada por um conjunto eletrônico (Figura 2). A imagem endotelial captada pelo aparelho é direcionada ao *software* que procede às análises quantitativa e qualitativa. A avaliação quantitativa é realizada pela estimativa da densidade endotelial, e a qualitativa por meio de estudo do tamanho e forma das células; presença de estruturas depositadas na superfície endotelial, e do estudo das alterações morfológicas do endotélio corneano ou membrana de Descemet. (Abib, 2000; Schor, Chamon, 1996; Phillips et al., 2005). (Figura 2)

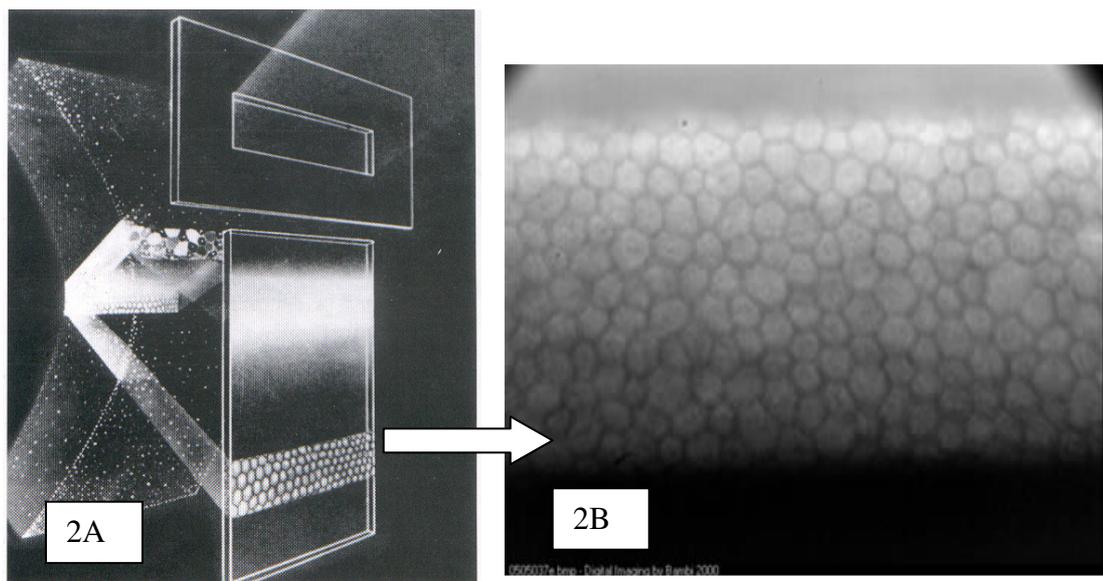


Figura 2: 2 A: Representação gráfica da reflexão especular do raio luminoso incidente sobre a superfície endotelial; 2 B: Imagem de microscopia especular do endotélio normal. (Fonte: Phillips et al., 2005)

O *software Cells Analyser PAT. REC* complementa a tecnologia dos microscópios especulares existentes, pela incorporação dos resultados destes equipamentos, obtendo o erro

amostral e inferindo-lhes validade estatística e conseqüentemente médica, para auxiliar os diagnósticos e condutas clínicas ou cirúrgicas, elevando a qualidade deste procedimento a um novo patamar de confiabilidade médica. O *software Cells Analyzer PAT. REC* calcula o erro amostral em exames já realizados, se é pequeno e tolerável ou grande e 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. (Abib, 2006).

### **1.1 Hipóteses**

Os dados amostrais (o erro relativo, o número de células contadas, área das amostras) endoteliais obtidos com e sem a intervenção do *software Cells Analyser PAT. REC*, orientando o número de células que devem ser contadas, para se obter uma confiabilidade de 95%, são estatisticamente diferentes.

Os dados semiológicos (o erro relativo, o número de células contadas, área das amostras endoteliais) obtidos com e sem a intervenção do *software* são iguais.

### **1.2 Relevância**

A microscopia especular é a técnica diagnóstica atualmente mais utilizada para avaliação qualitativa e quantitativa do endotélio corneal, sendo de vital importância na prática clínica, principalmente nos pré-operatórios de cirurgias intra-oculares e seleção de córnea doadora para transplantes. A tecnologia dos microscópios especulares existentes não permite o conhecimento do erro relativo, o que pode ocasionar uma interpretação errônea do resultado final.

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo geral**

Estudar imagens endoteliais da córnea, obtidas pela microscopia especular, comparando a amostra desta - contida em uma única imagem - com a composta por tantas imagens quantas necessárias para validação estatística do exame, segundo orientação do *software* específico para determinação do tamanho amostral em exames de microscopia especular de córnea.

## **2.2 Objetivo específico**

Conhecer o perfil dos dados amostrais - número de imagens, de células endoteliais, área endotelial avaliada e erro amostral - dos exames realizados com uma única imagem e com amostra endotelial composta por tantas imagens quanto necessárias para validar estatisticamente o exame.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### 3.1 Anatomia da córnea

Nishida (2005) relatou que a córnea é um tecido transparente, avascular, medindo horizontalmente 11 a 12 mm e verticalmente 9 a 11 mm, na superfície anterior. A espessura corneal central e periférica média é de aproximadamente 0,5 e 0,7 mm, respectivamente. A córnea é o elemento refrativo primário do sistema visual, contribuindo com 74% do poder dióptrico do olho. (Figura 3)

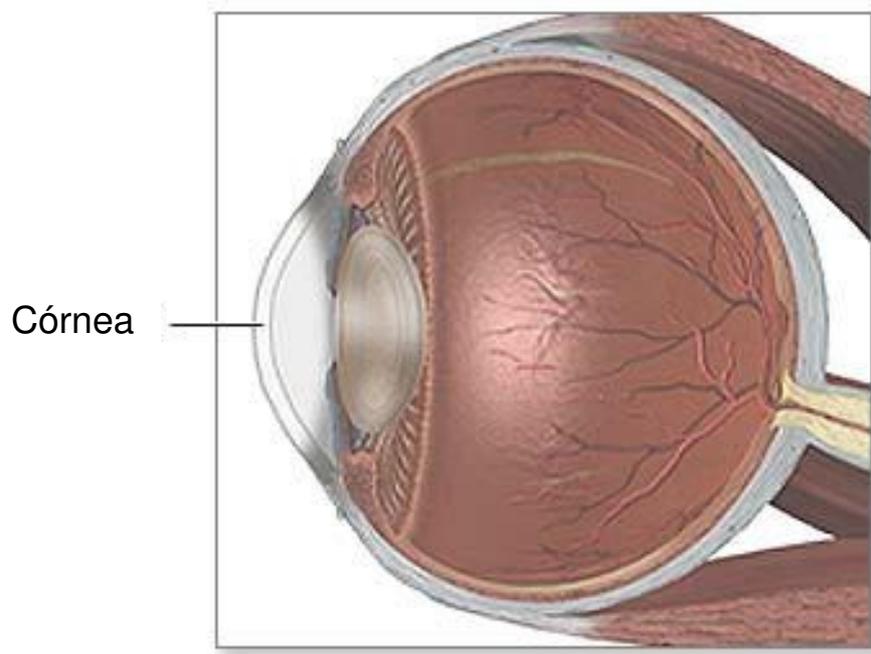


Figura 3: Desenho esquemático de corte longitudinal do globo ocular evidenciando a córnea. (Fonte: Kanski, 2002)

Krachmer et al. (2005) afirmaram que a córnea humana é composta por cinco camadas: epitélio com sua membrana basal, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. (Figura 4)

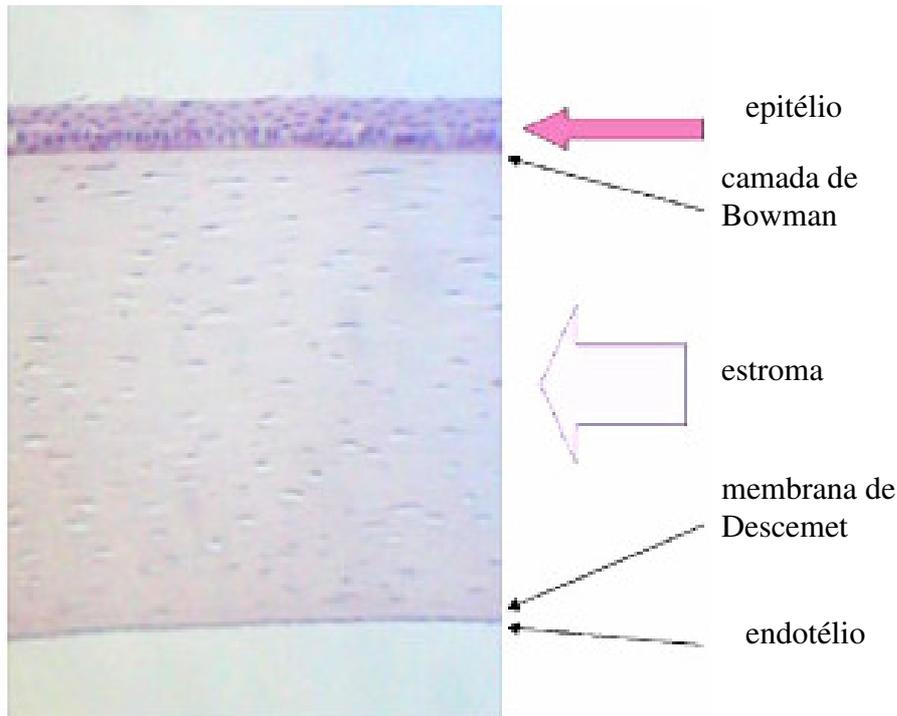


Figura 4: Corte histológico demonstrando as camadas da córnea. (Fonte: AAO, 2006)

### 3.2 Endotélio

#### 3.2.1 Histologia

Kreutziger (1976) estudou a morfologia e a relação das membranas plasmáticas das células endoteliais da córnea de coelhos, pela adição de lantânio nas preparações submetidas à microscopia eletrônica de transmissão (MET). Constatou a presença de interdigitações extensas entre as células endoteliais e a ocorrência de vários complexos juncionais dos tipos “gap junction” e “tight junction”.

Waring III et al. (1982) descreveram o endotélio corneano como uma camada única de células de aproximadamente 18 a 20 micra de largura, 4 a 6 micra de espessura, que revestem

posteriormente a córnea. As células endoteliais apresentaram morfologia predominantemente hexagonal, formando um verdadeiro mosaico.

### **3.2.2 Fisiologia**

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 corneal voltou à normalidade quando se usou 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 íons essenciais estejam presentes na solução a ser utilizada.

Waring III et al. (1982), após extensa revisão de literatura, relataram que a córnea apresenta a importante função de manter a transparência e espessura corneal por basicamente 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e da anidrase carbônica, do endotélio para a câmara anterior, culminando com o retorno da água.

Mishima (1982) afirmou que a lesão significativa de células endoteliais (número de células abaixo do limiar de 400 a 700 células/mm<sup>2</sup>) decorrente de causas inflamatórias, ou por trauma cirúrgico (cirurgia de catarata e de glaucoma), leva à falência endotelial e conseqüente edema da córnea, com perda localizada de sua transparência, evoluindo para uma descompensação e falência corneal permanente, com importante comprometimento da acuidade visual. (Figura 5)

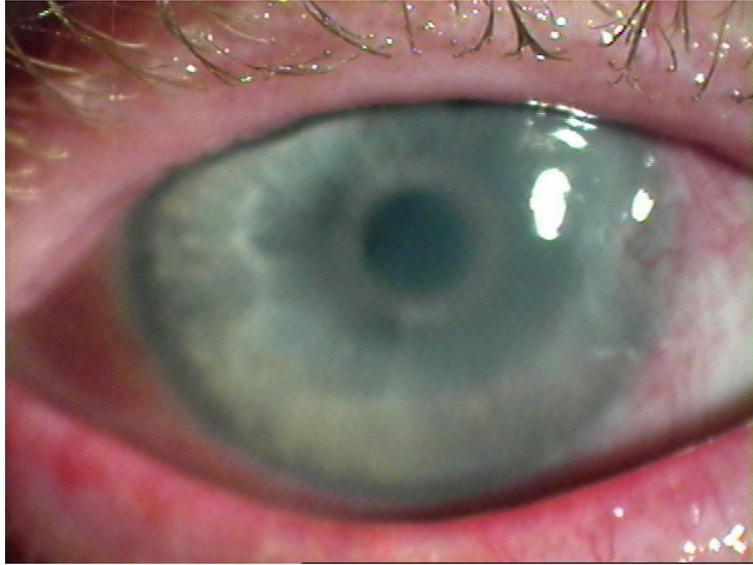


Figura 5: Edema corneal por descompensação e falência endotelial (Fonte: Foto da autora)

### **3.2.3 Regeneração endotelial**

Binder, Binder (1957) estudaram, pela microscopia óptica, a regeneração do endotélio corneal de coelhos sob condições normais e durante a cicatrização após trauma mecânico com espátula romba. Encontraram evidências de divisão celular amitótica nos endotélios examinados.

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

Van Horn et al. (1977) estudaram a regeneração endotelial após destruição de 10, 50 e 90% do endotélio corneal central de coelhos e gatos, pela paquimetria, microscopia eletrônica de transmissão e análise auto-radiográfica, observando 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 a regeneração celular pelo processo de alargamento e migração de células. Concluíram que a regeneração endotelial na córnea do gato apresenta um padrão semelhante ao da córnea humana.

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

Yee et al. (1985) estudaram a recuperação da função de bomba do endotélio corneal de coelhos após lesão por congelamento. Avaliaram o tecido por vários métodos: paquimetria óptica, ligação com a Ouabaína Tritiada (avalia a função de bomba do endotélio), montagem em câmaras de perfusão (avaliam a função endotelial de barreira), coloração com vermelho de Alizarina e azul de Tripán, microscopia especular de campo amplo com morfometria assistida por computador e microscopia eletrônica de varredura. Concluíram que a recuperação funcional do endotélio lesado precede a sua reorganização morfológica e que este processo pode ser dividido em três estágios: estágio I com a cobertura inicial da área lesada por células pleomórficas e fusiformes, formando barreira funcional incompleta e com mínima capacidade de bombeamento; estágio II: células assumem um aspecto mais achatado, formando polígonos irregulares e com capacidade quase normal de bombeamento, e estágio III: remodelamento da camada celular, que retoma seu aspecto usual de mosaico celular.

Matsuda et al. (1985) pesquisaram a cicatrização do endotélio corneal de coelhos *in vivo* após trauma mecânico com fio de seda 4-0, por 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 horas após a lesão) e um animal 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 compreendido entre três e doze horas de trauma. No período entre 24 e 48 horas pós-trauma, a superfície lesada ficou completamente recoberta de células grandes e irregulares.

### 3.2.4 Alterações decorrentes da idade

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

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

Waring III et al. (1982) relataram que com a idade ocorre perda celular, que não consegue ser suprida com a divisão das células remanescentes e que, para restabelecer a barreira funcional, se alargam de forma desigual, causando irregularidade do tamanho (polimegatismo) e na forma (pleomorfismo). (Figura 6)

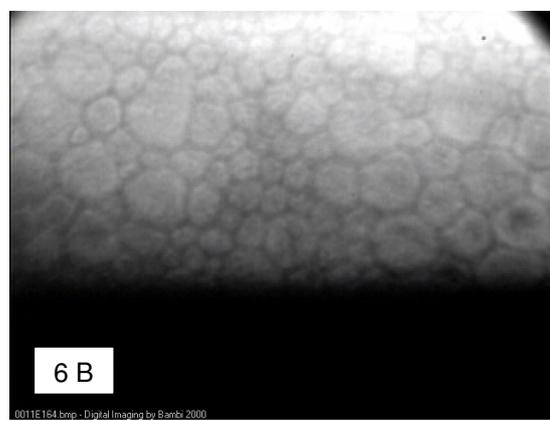
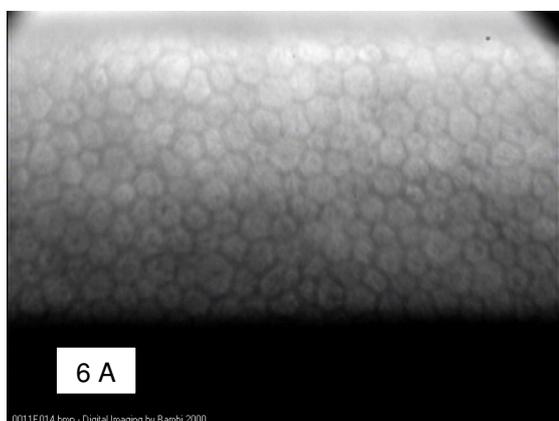


Figura 6: Foto de microscopia especular: 6 A: paciente com 17 anos, com endotélio regular, 6 B: paciente de 82 anos com alteração no formato e tamanho das células. (Fonte: Abib, 2006)

### **3.2.5 Semiologia endotelial**

Mishima (1982) avaliou a função e a morfologia do mosaico endotelial por três técnicas: paquimetria, microscopia especular e fluorfotometria corneal. A paquimetria avalia a espessura corneal e indiretamente a função endotelial; a microscopia especular avalia a função e morfologia do mosaico, e a fluorfotometria nos permite uma avaliação direta do estado funcional da barreira endotelial.

Abib (2000) introduziu o conceito de monitoramento biológico, fundamentado na medicina ocupacional, que é o acompanhamento de uma variável da biologia do corpo humano (mosaico endotelial) capaz de indicar alterações da fisiologia de um determinado órgão ou tecido (córnea), conseqüente a exposição de um determinado agente (lentes de contato, procedimentos cirúrgicos intra-oculares com ou sem implantes intra-oculares, 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 que possui características de uma lente biológica, transparente, sendo esta característica mantida pela função das suas células endoteliais.

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

Abib (2006) discorreu sobre a semiologia do mosaico endotelial 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 existente neste mosaico, além de avaliar estruturas anexas tais como células inflamatórias, depósitos endoteliais, dobras da membrana

de Descemet, vesículas, entre outros. Na avaliação semiológica da célula endotelial estuda-se:

1 - Tamanho celular endotelial médio ou área celular que representa o tamanho médio de uma determinada população de células estudadas. Sua unidade de área é o  $\mu\text{m}^2$ .

2 - Coeficiente de variação: a população de células endoteliais apresenta normalmente um determinado padrão de dispersão de tamanho em torno de um médio, esta dispersão é chamada de polimegatismo e também é indicativa de diminuição da reserva funcional destas células ou mesmo estresse ou sofrimento. O dado semiológico que avalia o polimegatismo é o coeficiente de variação (CV) que é dado pelo desvio padrão do tamanho celular médio dividido pelo tamanho celular médio, podendo ser expresso em termos decimais ou percentuais;

3 - Percentual de células hexagonais: a morfologia da célula endotelial normal é predominantemente hexagonal, uma pequena parte da população destas células pode ter seu número de lados diferente, sendo maiores ou menores que seis. Esta variação do número de lados é denominada de pleomorfismo e é indicativa de diminuição da reserva funcional destas células ou mesmo estresse ou sofrimento. Este aspecto morfológico celular é avaliado pelo percentual de células com menos de seis lados, seis lados e mais de seis lados.

### **3.3 Microscopia especular**

#### **3.3.1 Princípio físico**

Phillips et al. (2005) discorreram sobre o princípio físico da microscopia especular de córnea. Quando o feixe luminoso incide sobre uma superfície ocorrem três efeitos: a reflexão, a transmissão e a 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 córnea. (Figura 7)

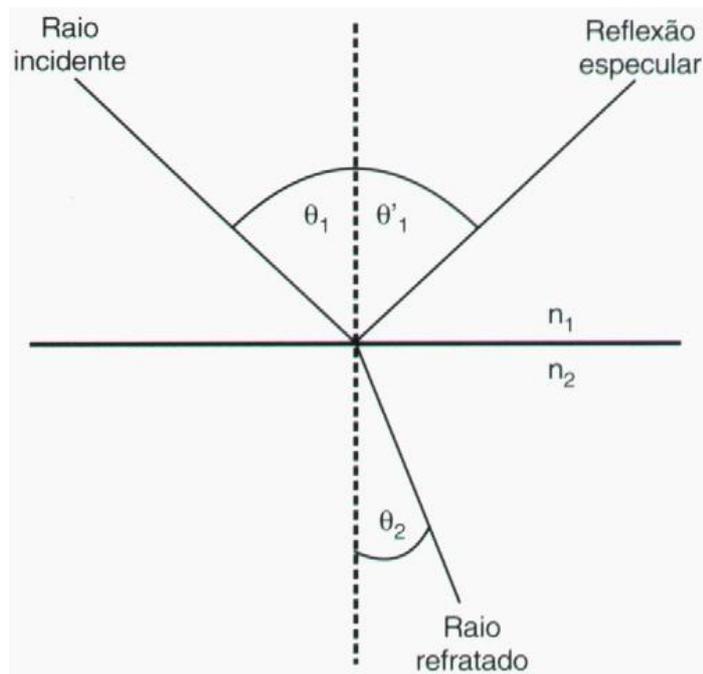


Figura 7 – Reflexão em uma superfície entre dois meios transparentes. Reflexão especular: ângulo do raio incidente ( $\theta_1$ ) é igual ao ângulo do raio refletido ( $\theta'_1$ ); o ângulo de refração ( $\theta_2$ ) depende dos índices refrativos dos meios. (Fonte: Abib, 2000)

### **3.3.2 Cronologia do desenvolvimento da microscopia especular de córnea**

Maurice (1968) proporcionou um grande avanço na pesquisa envolvendo o endotélio corneal, pois foi quem primeiramente descreveu a microscopia especular, que se baseia na reflexão de um feixe luminoso incidente sobre a superfície regular do endotélio da córnea, onde parte reflete de forma especular, permitindo a observação *in vivo* das células endoteliais, sem causar lesão às mesmas.

Laing et al. (1975) modificaram o microscópio descrito por Maurice (1968), permitindo a execução de exames *in vivo* e o registro fotográfico dos mesmos.

Bourne, Kaufman (1976) introduziram melhoramentos 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.

Binkhorst et al. (1978) realizaram um estudo do endotélio corneal, pela microscopia de córnea de pacientes submetidos à cirurgia de catarata com implante de lente intra-ocular, e concluíram que a microscopia ajuda na avaliação da viabilidade do endotélio corneal, antes do surgimento de sinais de descompensação corneal. Encontraram diminuição da densidade celular do endotélio nos pacientes operados de catarata com implante de lente intra-ocular.

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.

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

Lohman et al. (1981) realizaram estudo com microscopia especular de contato com imersão da lente objetiva em fluoreto de magnésio, que resultou em decréscimo no índice de refração e promoveu contato estável com a córnea, obtendo assim uma visão alargada do endotélio, permitindo também, com a mudança do foco, a avaliação de outras camadas da córnea.

Yee et al. (1985) estudaram o endotélio corneal de várias espécies animais (inclusive o coelho) 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.

Yee et al. (1986) desenvolveram um método para obtenção da densidade celular e coeficiente de variação, por comparação com painéis pré-determinados de delineamento celular.

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

Doughty (1992) estudou o formato celular do endotélio corneano de coelhos, considerando a simetria dos lados das células, ou seja, quão mais hexagonal seria sua forma. Pela 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 conta 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 a área celular média para cada grupo, juntamente com o desvio-padrão e uma 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.

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

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

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), relatando a importância do uso da MEC na avaliação quantitativa e qualitativa do endotélio corneal.

### **3.3.3 Classificação dos Microscópios espaciares**

Benetz et al. (1999) concluíram que o sistema de análise de imagem do KONAN NONCON ROBO-CA SP-8000® poderia ser usado em triagens clínicas de larga escala para avaliação da perda celular, e que o microscópio espacial de não-contato tem vários benefícios clínicos como o conforto do paciente, a facilidade de uso do aparelho e o pequeno tempo gasto na realização do exame. (Figura 8)



Figura 8: Microscópio espacial de não-contato NONCON ROBO-CA SP-8000®. (Fonte: Foto da autora)

Abib (2000) aborda sobre os principais modelos de microscópios espaciares em uso pelo mundo: 1) Microscópios espaciares de contato: BIO OPTICS LSM 12000, LSM 12000 CT, LSM 2200, LSM 2100E, LSM 2100C, LSM 2000C, TOMEY EM-1100, KEELER KONAN, CELL MAX; 2) Microscópios espaciares de não-contato: NONCON ROBO SP-6000, NONCON ROBO PACHY SP-9000; SEED SP-500, TOPCON SP 1000 e SP-2000P; 3) Os microscópios confocais NIDEK CONFOSCAN 3 e CORNEA CONFOCAL

Jurkunas, Couby (2005) discorreram sobre os vários modelos de microscópios especulares disponíveis no mercado, classificados quanto à existência de contato ou não com a córnea. Relataram que ainda podem ser classificados quanto ao modo de análise dos dados em não automatizados, semi-automatizados e automatizados. Nos não automatizados a avaliação endotelial fica a cargo do operador, por meio de comparação do endotélio em análise com grades predeterminadas que forneçam padrões de densidade endotelial e morfologia celular. Nos semi-automatizados são oferecidos recursos para análise endotelial, porém é necessário que o operador do equipamento interaja com o *software* e a imagem endotelial captada. Os automatizados oferecem recurso informatizado para a análise endotelial, sem que haja necessidade de o operador interagir com o software do aparelho ou com a imagem endotelial captada. Concluíram que os melhores equipamentos são os semi-automatizados pela sua precisão.

### **3.3.4 Softwares para análise das imagens endoteliais**

#### **3.3.4.1 Surgimento dos *softwares***

Siesrtsema et al. (1993) estudaram as amostras endoteliais utilizando um software de análise de imagem, desenvolvido pelos autores, que inseriu diretamente a imagem do microscópio especular no computador pelo digitalizador de vídeo em combinação com um software de modificação de imagem, diminuindo 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. Foi calculada a área celular de cada célula circundada, e, a partir dessa 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. Os autores concluíram sugerindo que o método de análise computadorizada em questão teria melhor sensibilidade se associado a um microscópio especular de contato de campo alargado.

Landesz et al. (1995) realizaram um estudo comparando o *software* para análise da imagem endotelial do microscópio especular KONAN NONCON ROBO-CA SP-8000® com o

software 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 softwares, que o KONAN NONCON ROBO-CA SP-8000® seria indicado para uma rápida análise morfológica endotelial e que o KONAN KEELER SP-3300® seria o mais indicado para estudos detalhados e fotografias do endotélio corneal.

Vecchi et al. (1996) avaliaram a densidade endotelial corneal utilizando o microscópio especular TOPCON SP 1000® e *software Image-NET* ® na forma automatizada, semi-automatizada e manual. Os resultados do estudo concluíram que a forma automatizada não apresenta a precisão necessária para o seu uso clínico. No estudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a forma não automatizada e a manual.

Benetz et al. (1999) encontraram uma densidade endotelial significativamente maior na análise realizada pelo sistema de análise de imagem da KONAN ® com retículo fixo quando comparada com a da densidade endotelial pelo sistema de análise de imagem da *Bio-Optics Bambi*®.

Ohno et al. (1999) estudaram o endotélio corneal de 26 córneas de 13 indivíduos normais e 41 córneas de 28 indivíduos que tinham realizado ceratoplastia penetrante, através do 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 *software* BAMBI versão 6.1 da *Bio-Optics*, após calibração, com dois métodos: o de marcação dos centros celulares da KONAN 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.

#### **3.3.4.2 Métodos de determinação da densidade celular**

Alanko, 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  $\text{mm}^2$ . (Figura 9)

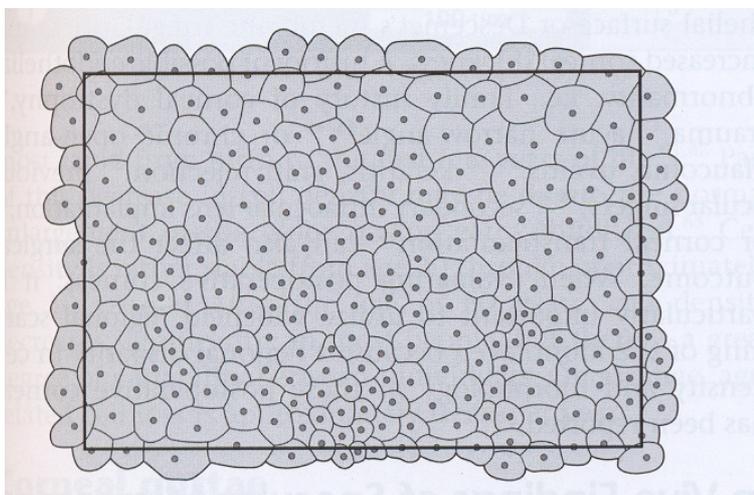


Figura 9: Desenho esquemático do método de análise do retículo fixo: somente as células dentro do retângulo serão contadas. (Fonte: Phillips et al., 2005)

Benetz et al. (1999) descreveram o método da marcação dos centros celulares para avaliação da densidade endotelial com a marcação do centro de um grupo de células vizinhas (marcação de aproximadamente 50 células); com cálculo da densidade celular por  $\text{mm}^2$  pela divisão do número de células contadas pela área ocupada por elas. (Figura 10)

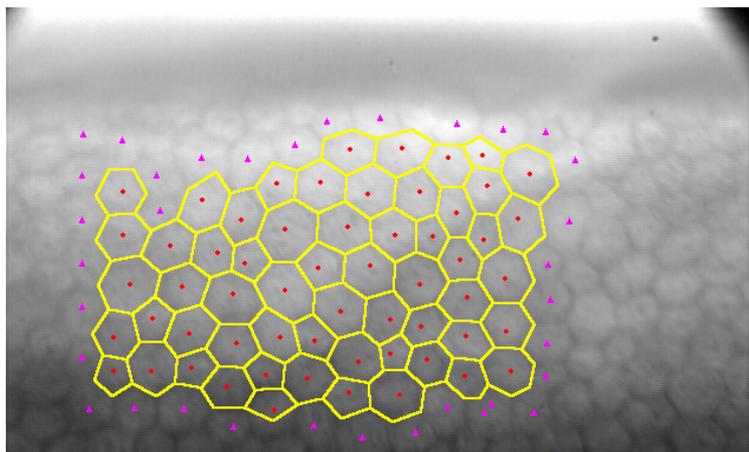


Figura 10: Avaliação da densidade endotelial pelo método de marcação dos centros celulares realizada pelo *Bambi 2000 Plus*®. (Fonte: Abib, 2006)

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  $\text{mm}^2$  é calculada pela divisão do número de células contadas pela área celular. O autor considerou esse método mais exato que o do retículo fixo, pois todas as células delimitadas são contadas. (Figura 11)

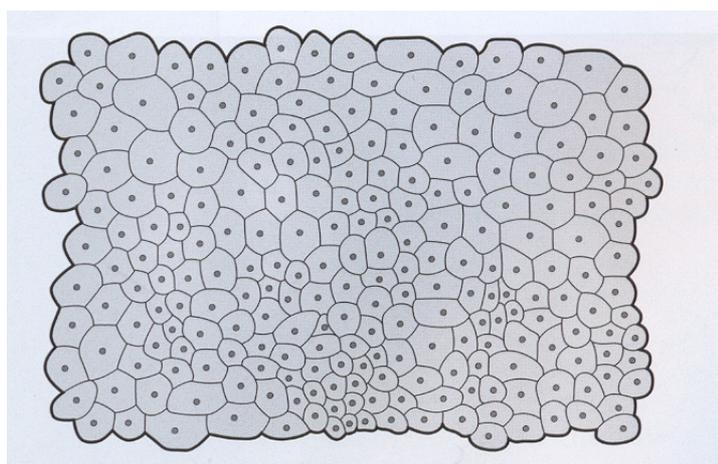


Figura 11: Desenho esquemático do método de análise do retículo móvel: as bordas de um grupo de células são circundadas. (Fonte: Phillips et al., 2005)

### **3.3.5 Análise crítica do atual estado da microscopia especular**

Rao et al. (1978) realizaram um estudo do endotélio corneal central e periférico pela microscopia especular de contato em pacientes submetidos à facectomia, e 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.

Hirst (1980), após revisão da literatura disponível sobre microscopia especular, afirmou 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. Aponta alguns problemas metodológicos do exame, como a inacessibilidade ao endotélio corneal periférico (dois a três milímetros do limbo); a dificuldade da MEC 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 o tempo de seguimento do endotélio de um paciente submetido a uma cirurgia intra-ocular.

Schor, Chamon (1996) consideraram a MEC um exame específico de indicações limitadas e do alto custo, sendo economicamente viável em 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.

Abib (2006), após revisão extensa da literatura, concluiu que os aparelhos disponíveis no mercado calculam a mediana ou 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 destes 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 encontrados na população normal em 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.

### **3.3.6 Software para determinação do erro amostral e do tamanho da amostragem endotelial**

Abib (2006) demonstra, por meio do *Cells Analyzer* PAT. REC., *software* cuja finalidade de laboratório estatístico para análise de amostras endoteliais, obtidas pela microscopia especular de córnea, o erro existente no processo de amostragem em exames realizados, orientando o tamanho da amostra endotelial a ser considerada na amostragem desta, para que o exame adquira confiabilidade e reprodutibilidade, além de realizar análise etária dos dados semiológicos investigados pela microscopia especular de córnea. O autor aponta como limitações do *software* 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; presença de mosaicos endoteliais com falhas no revestimento das células.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

## **4.1 Caracterização e população do estudo**

### **4.1.1 Caracterização do estudo**

Trata-se de um estudo transversal que apresenta, como vantagem, a objetividade na coleta dos dados, resultados de fácil interpretação, facilidade para obtenção de amostras representativas da população, boa opção para descrever as características dos eventos na população. Apresenta, como desvantagens, o fato de que condições de baixa prevalência exigem amostras de grande tamanho, e que dados da exposição atual podem não representar a exposição passada. (Pereira, 2000)

### **4.1.2 População do estudo**

- População: seres humanos
- Base: olhos
- Alvo: microscopia especular de córnea
- Amostra: dados do endotélio corneal, obtidos do banco de dados de exames de microscopia especular de córnea da Clínica de Medicina Especializada, Curitiba, Paraná.

## **4.2 Apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa**

Para fins de apreciação dos aspectos éticos implicados em pesquisa em seres humanos, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Católica de Goiás, sob o número CAAE- 0847.0.000.168-06. (Anexo 1)

### **4.3 Material**

#### **4.3.1 Seleção da amostra**

Foi feito um levantamento consecutivo de todos os exames de microscopia especular de córnea, realizados no período de setembro a novembro de 2005, no Serviço de Córnea da Clínica de Medicina Especializada, totalizando 416 olhos de 212 pacientes.

Dos 416 olhos, foram avaliados 213 olhos direitos e 203 esquerdos.

Desses, foram excluídos 118 exames - 76 por estarem incompletos para a metodologia utilizada e 42 por não apresentarem boas condições técnicas para análise endotelial no número de imagens necessárias para a metodologia do estudo, em decorrência de doenças que causam diminuição da transparência corneal ou alterações focais do mosaico endotelial. A amostra foi então constituída de 298 olhos, 149 direitos e 149 esquerdos.

#### **4.3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão**

##### **4.3.2.1 Critérios de inclusão**

Cada exame incluído deve ter número suficiente de imagens endoteliais que propiciem a aplicação da metodologia a seguir apresentada. O exame deve ter sido realizado na córnea, cuja condição de transparência determine boa qualidade de imagem endotelial, para que a metodologia de marcação das células endoteliais e de análise do tamanho da amostra possa ser feita de modo preciso.

##### **4.3.2.2 Critérios de exclusão**

Presença de lesões complexas anexas ao mosaico endotelial que comprometam a superfície posterior do mosaico endotelial, de forma total ou parcial, encontradas na córnea "guttata", distrofia endotelial de Fuchs, distrofia polimorfa posterior e síndrome endotelial iridocorneal.

## 4.4 Métodos

### 4.4.1 Caracterização da amostra

A amostra foi caracterizada quanto ao sexo, idade, estado e/ou situação endotelial, e dados semiológicos das imagens endoteliais (densidade endotelial, área celular, coeficiente de variação e percentual de células hexagonais).

### 4.4.2 Microscopia especular de córnea

Os exames de microscopia especular de córnea foram realizados com microscópio especular de alta ampliação, semi-automatizado, de contato, *Bio-Optics@ LSM 2000C*.<sup>1</sup> (Figura 12)

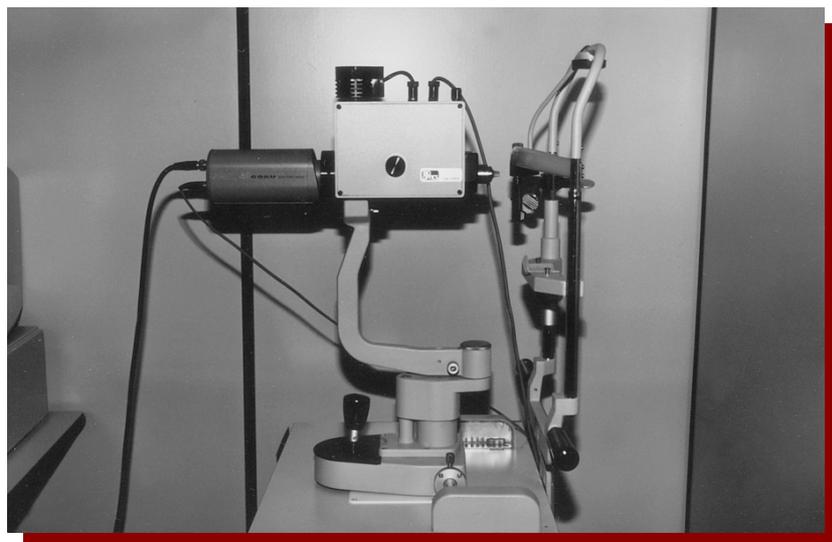


Figura 12: Microscópio especular de contato BIO-OPTICS@ LSM 2000C.

(Fonte: Foto da autora)

---

<sup>1</sup>*Bio-Optics@ LSM 2000C* Bio Optics Inc, Porthland, USA

#### **4.4.3 Técnica utilizada para a captação das imagens endoteliais**

A descrição da técnica utilizada para a realização do exame de microscopia especular de contato é a preconizada por Abib, 2000, adaptada para a utilização do *Cells Analyzer* PAT. REC.<sup>2</sup>:

- Anti-sepsia da lente objetiva com álcool a 90%<sup>3</sup> previamente ao exame;
- Instilação de colírio de cloridrato de proximetacaína a 0,5% (anestalcon 0,5%<sup>® 4</sup>);
- Posicionamento do paciente;
- Deslizamento da lente objetiva sobre a superfície corneal com o objetivo de focalizar área do mosaico endotelial com boa qualidade técnica para captura;
- Captura digital e análise das imagens do mosaico endotelial.

Todos os exames foram realizados pelo mesmo médico oftalmologista, treinado na aquisição, processamento e obtenção dos dados das amostras endoteliais em estudo.

#### **4.4.4 Captura da amostragem endotelial**

A captura da amostragem endotelial foi realizada com a obtenção de imagens do mosaico endotelial pelo microscópio especular de córnea com a técnica acima descrita. (Figura 13)

---

<sup>2</sup> *Cells Analyzer* PAT. REC. Technicall, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup> Álcool a 90%.J.R.D. Indústria Farmacêutica Ltda, Goiânia, Brasil.

<sup>4</sup> Anestalcon 0,5%<sup>®</sup> Alcon Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil

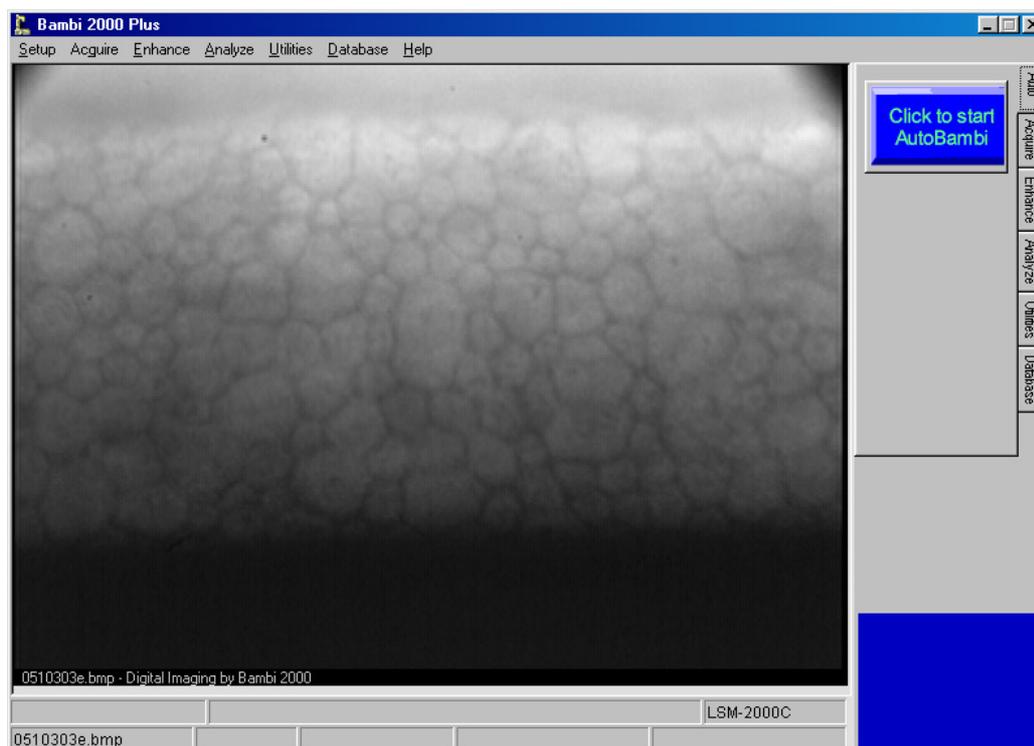


Figura 13: Tela do *software Bambi 2000 plus®* após a captação da imagem pelo microscópio especular. (Fonte: Foto da autora)

#### **4.4.5 Marcação das células endoteliais**

Após a captura das imagens endoteliais, consideradas como amostras, todas as células contidas nas imagens foram marcadas pela técnica da marcação dos centros celulares. As células endoteliais da linha externa não foram consideradas para a determinação dos dados semiológicos do endotélio corneal, e delimitaram a margem celular mais externa da área do mosaico endotelial circunscrito por esta linha externa de células. (Figura 14)

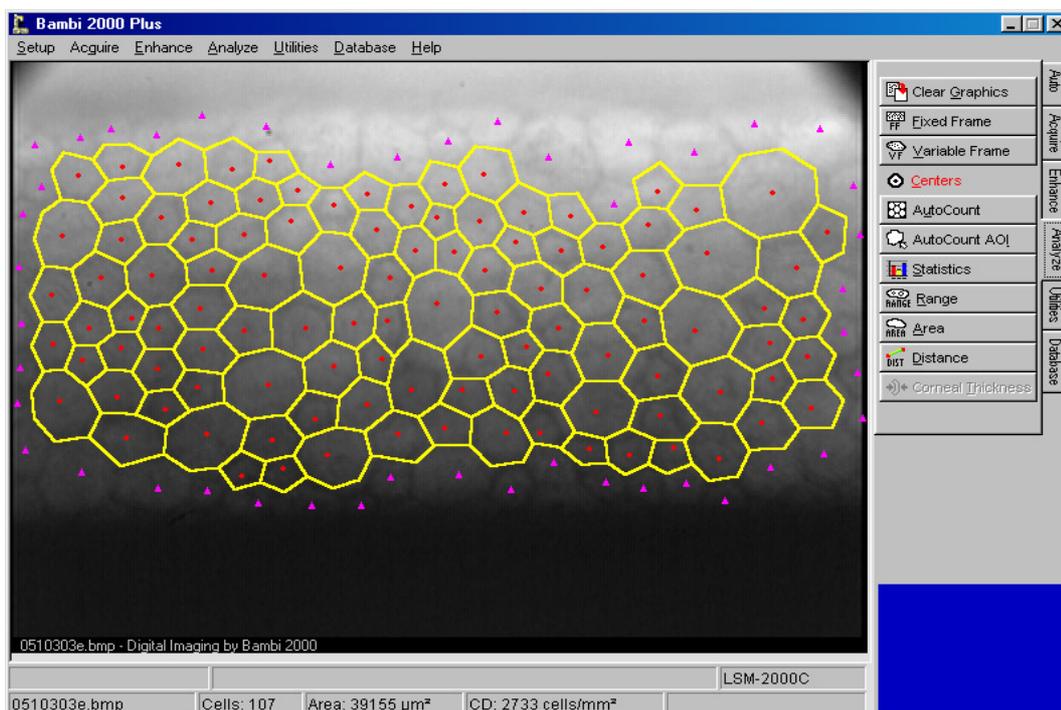


Figura 14: Tela fornecida pelo *software Bambi 2000 plus®*, demonstrando a marcação dos centros celulares. (Fonte: Foto da autora)

#### **4.4.6 Avaliação das imagens endoteliais pelo *software Bambi 2000 plus®*<sup>5</sup>**

Em cada uma das imagens foram calculados pelo *software Bambi 2000 plus®* os seguintes dados semiológicos: (Figura 15)

- 1 - Densidade endotelial (células/mm $^2$ );
- 2 - Tamanho celular endotelial médio ou área celular ( $\mu\text{m}^2$ );
- 3 - Coeficiente de variação;
- 4 - Percentual de células hexagonais.

<sup>5</sup> *Bambi 2000 plus®* Bio Optics Inc, Porthland, USA

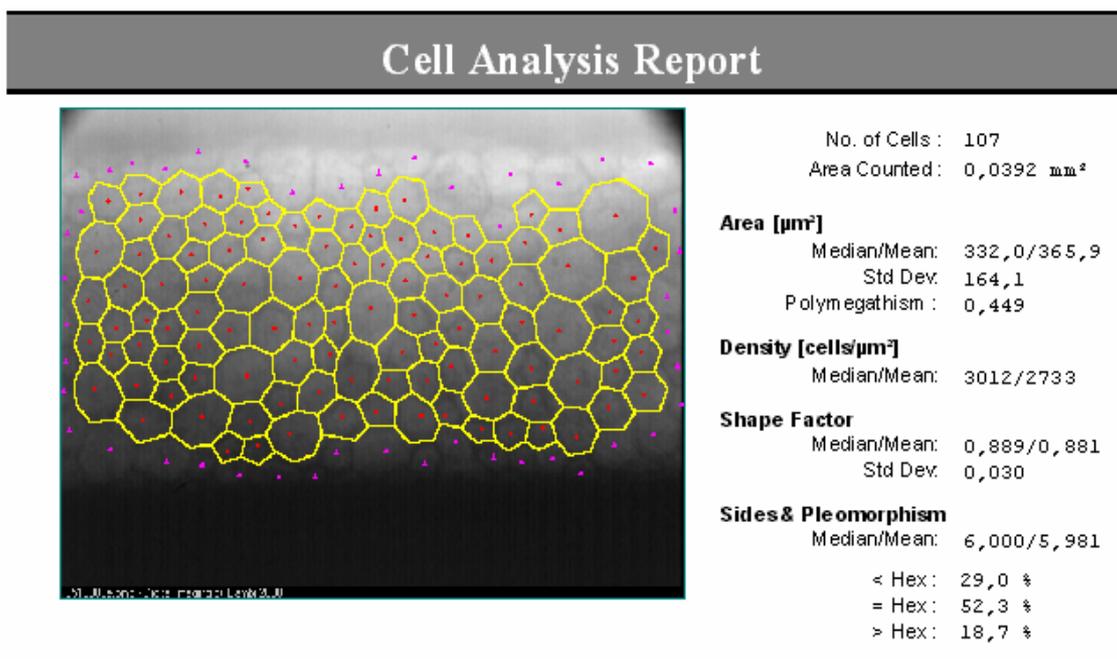


Figura 15: Laudo fornecido pelo *software Bambi 2000 plus@*, demonstrando os dados semiológicos calculados. (Fonte: Foto da autora)

#### **4.4.7 Utilização do *Cells Analyzer PAT. REC.*, para análise das amostras endoteliais**

##### **4.4.7.1 Poder estatístico amostral**

Na utilização do *Cells Analyzer PAT. REC.*, para análise das amostras endoteliais, inicialmente o poder estatístico amostral foi escolhido (grau de confiança de 95% com erro relativo planejado de 5%). (Figura 16)

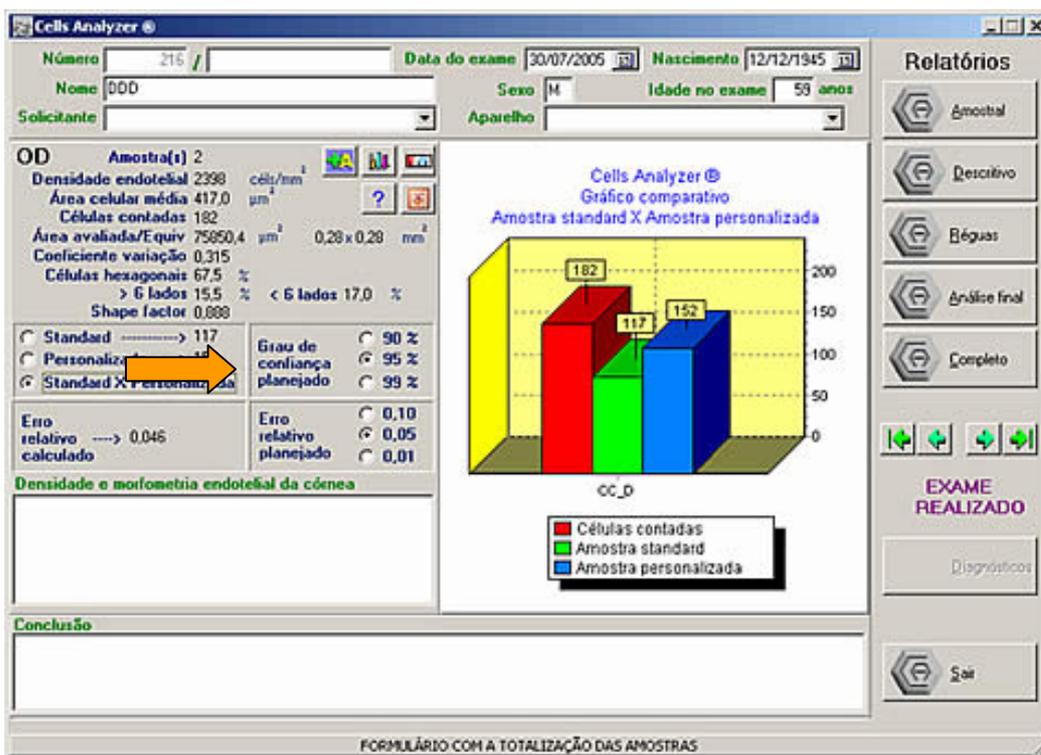


Figura 16: Tela fornecida pelo *software Cells Analyzer PAT. REC.*, demonstrando a escolha do grau de confiança. (Fonte: Foto da autora)

#### 4.4.7.2 Alimentando o Cells Analyzer

Após a escolha do erro relativo, o *software Cells Analyzer PAT. REC.* foi alimentado com:

##### - Dados do paciente

Todo paciente incluído no estudo teve sua idade considerada no *Cells Analyzer PAT. REC.*, para efeito de análise amostral do mosaico endotelial em exame. (Figura 17)

The screenshot displays the 'Cells Analyzer' software interface. At the top, there are fields for patient identification: 'Número' (2508), 'Nome' (MGC), 'Data do exame' (25/08/2006), 'Sexo' (F), 'Nascimento' (02/01/1965), and 'Idade no exame' (41 anos). The 'Aparelho' is set to 'BIO-OPTICS LSM 2.000 C'. An orange arrow points to the 'Número' field.

The main area is divided into two columns for 'OD' and 'OE' analysis. Each column contains the following parameters:

- Amostra(s): 0
- Densidade endotelial: 0 céls/mm<sup>2</sup>
- Área celular média: 0,0 μm<sup>2</sup>
- Células contadas: 0
- Área avaliada/Equiv: 0,0 μm<sup>2</sup> x 0,00 mm<sup>2</sup>
- Coefficiente variação: 0,000
- Células hexagonais > 6 lados: 0,0 %
- Células hexagonais < 6 lados: 0,0 %
- Shape factor: 0,000

Below these parameters are radio buttons for 'Standard', 'Personalizada', and 'Standard X Personalizada', and a 'Grau de confiança planejado' section with options for 90%, 95%, and 99%. There is also an 'Erro relativo calculado' field set to 0,000 and an 'Erro relativo planejado' section with options for 0,10, 0,05, and 0,01.

At the bottom of each column, there is a green header 'Densidade e morfometria endotelial da córnea' and a 'Conclusão' field with a question mark.

On the right side, there is a 'Relatórios' panel with buttons for 'Amostrai', 'Descritivo', 'Réguas', 'Análise final', and 'Completo'. Below this panel are four green arrows pointing right, a 'EXAME REALIZADO' label, and buttons for 'Diagnósticos' and 'Sair'.

The status bar at the bottom reads 'FORMULÁRIO COM A TOTALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS'.

Figura 17: Tela fornecida pelo *software Cells Analyzer PAT. REC.*, demonstrando a inserção dos dados de identificação do paciente. (Fonte: Foto da autora)

#### -Dados semiológicos das imagens endoteliais

O *software Cells Analyzer PAT. REC.* foi alimentado com os dados semiológicos das imagens endoteliais, calculados pelo *software Bambi 2000 Plus*® (densidade endotelial, área celular, coeficiente de variação e percentual de células hexagonais). (Figura 18)



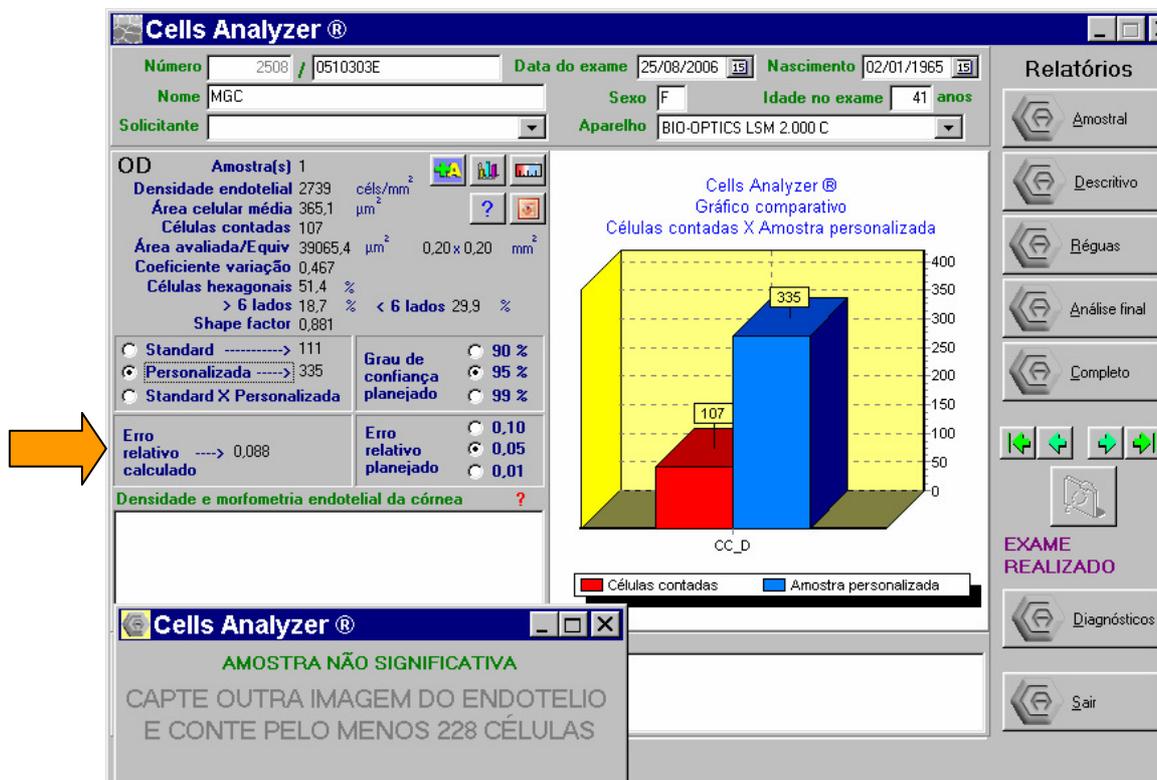


Figura 19: Tela fornecida pelo software *Cells Analyzer* PAT. REC., demonstrando que o erro relativo calculado foi maior que o planejado. (Fonte: Foto da autora)

- O erro relativo calculado menor que o planejado indica amostragem suficiente em número de células consideradas.

#### 4.4.9 Aumento da amostragem endotelial nos exames com número de células insuficientes

Nos olhos em que o *Cells Analyzer* PAT. REC. indicou amostragem insuficiente, adquiriram-se imagens distintas do mosaico endotelial, com subsequente marcação de células, a fim de gerar dados amostrais referentes à nova imagem e à inserção dos dados calculados pelo *Bambi 2000 plus*®, no *Cells Analyzer* PAT. REC., como complementação amostral.



- Número de células contadas;
- Número de imagens consideradas;
- Área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ );
- Equivalência ( $\text{mm}^2$ );
- Erro amostral (erro relativo calculado).



Figura 21: Tela fornecida pelo *software Cells Analyzer PAT. REC*, demonstrando os dados semiológicos do exame composto por três imagens endoteliais e respectiva análise amostral estatística. (Fonte: Foto da autora)

#### 4.4.11 Dados da semiologia endotelial calculados pelo Cells Analyzer<sub>PAT. REC.</sub>

A partir dos exames realizados sob a orientação do tamanho amostral para o mosaico endotelial de cada córnea foi calculado o resultado de cada um dos dados semiológicos da semiologia endotelial, tais como densidade endotelial, área celular média, coeficiente de variação e percentual de células hexagonais, porém estes não foram os objetivos do presente estudo. (Figura 22)



Figura 22: Laudo fornecido pelo software Cells analyzer<sub>PAT. REC.</sub> (Fonte: Foto da autora)

#### 4.5 Caracterização dos grupos

- Grupo 1: composto pelos dados amostrais dos exames considerados corretos pelo software Cells Analyzer<sub>PAT. REC.</sub> onde o erro relativo foi inferior a 5%, observando-se uma só imagem do mosaico endotelial.
- Grupo 2 A: composto pelos dados amostrais da primeira imagem dos exames considerados incompletos pelo software Cells Analyzer<sub>PAT. REC.</sub>, (erro relativo superior a 5%).

- Grupo 2 B: composto pelos dados amostrais dos exames que consideram tantas imagens quantas necessárias para que o exame fosse considerado completo pela análise do *software Cells Analyzer PAT. REC.*, com erro relativo inferior a 5%.

#### **4.6 Apresentação dos dados amostrais dos exames endoteliais**

Para os três grupos estudados, as variáveis quantitativas dos dados amostrais calculadas pelo *software Cells Analyzer PAT. REC.* foram relatadas por meio de estatística descritiva: valor máximo e mínimo, média e desvio padrão.

##### **- Grupo 1, 2 A e 2 B**

Número de imagens consideradas;

Número de células contadas;

Área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ );

Equivalência ( $\text{mm}^2$ );

Erro amostral (erro relativo calculado).

#### **4.7 Comparações realizadas com os dados amostrais obtidos e metodologia -**

##### **estatística utilizada**

##### **Comparação 1:**

##### **Grupo 1 X Grupo 2 A**

Os dados amostrais comparados, para amostras não pareadas, foram o número de células contadas, a área endotelial avaliada, a equivalência da área total avaliada em relação ao  $\text{mm}^2$  e erro amostral, pelo teste t - Student bicaudal com nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ).

**Comparação 2:****Grupo 2 A X Grupo 2 B**

Os dados amostrais comparados, para amostras pareadas, são o número de células contadas, área endotelial avaliada, equivalência da área total avaliada em relação ao  $\text{mm}^2$  e erro amostral, pelo teste t - Student bicaudal com nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ).

**Comparação 3:****Grupo 1 X Grupo 2 B**

Os dados amostrais comparados, para amostras não pareadas, são o número de células contadas, área endotelial avaliada, equivalência da área total avaliada em relação ao  $\text{mm}^2$  e erro amostral, pelo teste t - Student bicaudal com nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ).

Os cálculos matemáticos foram realizados com ajuda dos programas de computação SPSS for Windows versão 8.0 (SPSS, EUA) e Excel 2000 (Microsoft Corporation, EUA).

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 Resultados obtidos segundo a caracterização da amostra

### 5.1.1 Idade

A idade dos pacientes variou de 13 a 87 anos, com média de  $48 \pm 19$ .

### 5.1.2 Sexo

Quanto à distribuição por sexo, 96 (64%) indivíduos eram do sexo feminino e 54 (36%) do sexo masculino.

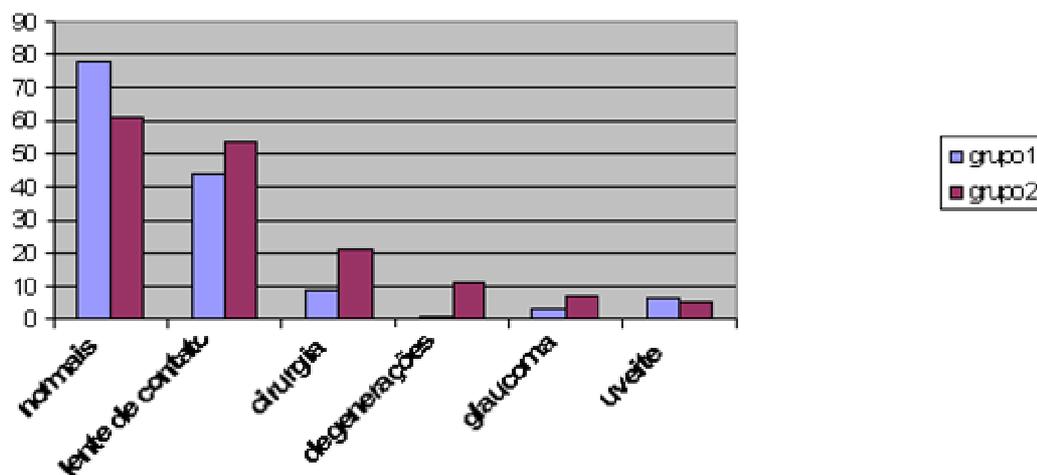
### 5.1.3 Indicação do exame de microscopia especular

A situação do mosaico endotelial, na indicação do exame de microscopia especular, foi considerada normal em 46% dos olhos examinados, em 33% foi compatíveis com uso de lentes de contato; em 10% compatível com estado endotelial pós-cirúrgico; em 4% com degeneração endotelial; em 4% com uveíte, e em 3% foram compatíveis com glaucoma. (Gráfico 1, Tabela 1)

Tabela 1 - Distribuição e frequência dos pacientes por indicação do exame de microscopia especular de córnea. (Brasília; 2006)

	Número de olhos examinados
Normais	139 (46%)
Lentes de Contato	98 (33%)
Cirurgia	28 (10%)
Degenerações	12 (4%)
Glaucoma	10 (3%)
Uveíte	11 (4%)
Total	298 (100%)

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes nos grupos 1 e 2 de acordo com estado endotelial.  
(Brasília; 2006)



#### **5.1.4 Dados semiológicos referentes à primeira imagem endotelial**

Os dados da semiologia endotelial que descrevem a primeira imagem endotelial dos 298 exames de microscopia especular do estudo encontram-se abaixo relatados.

A menor densidade endotelial foi de 1.161 células/mm<sup>2</sup> e a maior de 4.078 células/mm<sup>2</sup>, com média de 2.822 ± 558 células/mm<sup>2</sup>. (Tabela 2)

A menor área celular média foi de 140 μm<sup>2</sup> e a maior foi de 962 μm<sup>2</sup>, com média de 372 ± 107 μm<sup>2</sup>. (Tabela 2)

O menor coeficiente de variação foi de 0,19 e o maior de 0,467, com média de 0,289 ± 0,04. (Tabela 2)

O menor percentual de células hexagonais foi de 23% e o maior de 81,9%, com média de 57 ± 8,5%. (Tabela 2)

Tabela 2 - Dados semiológicos da primeira imagem dos exames do universo amostral. (Brasília, 2006)

Variável	Densidade endotelial (células/mm <sup>2</sup> )	Área celular (µm <sup>2</sup> )	Coeficiente de variação	Percentual de células hexagonais (%)
Média	2822 ± 558	372 ± 107	0,289 ± 0,04	57 ± 8,5

## 5.2 Demonstrativo do tamanho das amostras endoteliais para obtenção de validade estatística

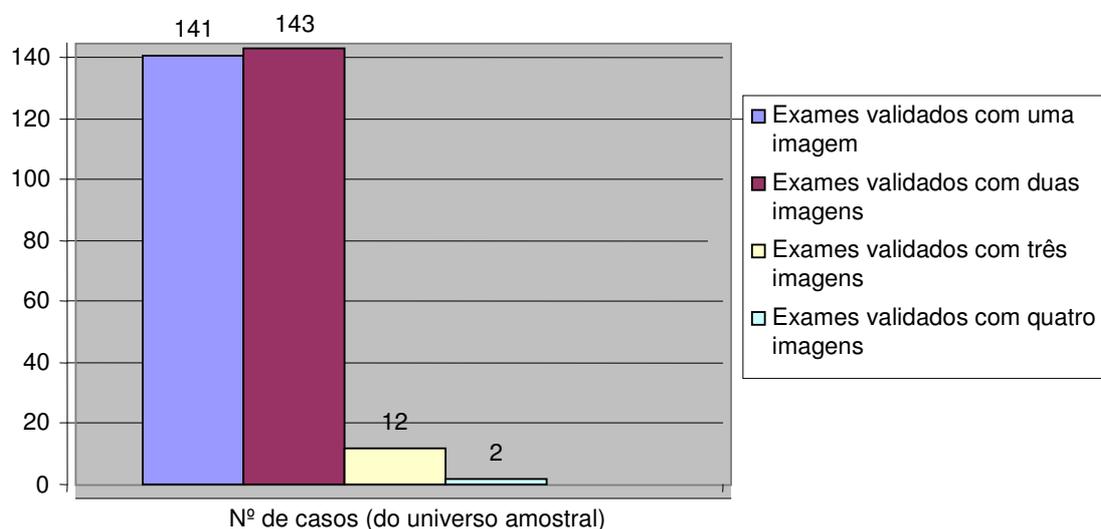
### 5.2.1 Número de imagens necessárias por exame

A amostra foi composta de 298 olhos, destes, 141 (47%) olhos necessitaram de apenas uma imagem para realizar o exame orientado pelo *software Cells Analyzer PAT. REC*, 143 (47,6%) olhos necessitaram de duas imagens, 12 (4%) olhos de três imagens, e 2 (0,7%) olhos de quatro imagens. (Tabela 3, Gráfico 2)

Tabela 3 - Distribuição dos exames de acordo com o número de imagens necessárias para validar estatisticamente o exame (Brasília, 2006)

Número de imagens para validar exame	Número de casos estudados
1	141 (47%)
2	143 (48%)
3	12 (4%)
4	02 (1%)
Total	298 (100%)

Gráfico 2 - Distribuição dos exames de acordo com o número de imagens necessárias para validar estatisticamente o exame (Brasília, 2006)



Nos 298 olhos estudados sob a orientação do *Cells Analyzer PAT. REC.*, o número médio de imagens consideradas no exame, para o perfil do microscópio especular marca *Bio-Optics®*, foi de  $1,7 \pm 0,6$  imagens por exame.

### **5.2.2 Número de exames por situação clínica considerados corretos com uma ou com mais de uma imagem.**

Dos 139 olhos com endotélio normal, 78 (56,1%) foram considerados corretos com uma imagem, e 61 (43,9%) necessitaram de aquisição da nova imagem ou imagens.

Dos 98 olhos de usuários de lentes de contato, 44 (44,9%) foram considerados corretos com uma imagem, e 54 (55,1%) necessitaram de aquisição de nova imagem ou imagens.

Dos 28 olhos com estado endotelial pós-cirúrgico, 9 (32%) foram considerados corretos com uma imagem, e 19 (68%) necessitaram de aquisição de nova imagem ou imagens.

Dos 12 olhos com degeneração endotelial, 1 (8,3%) foi considerado correto com uma imagem, e 11 (91,7%) necessitaram de aquisição de nova imagem ou imagens.

Dos 10 olhos com glaucoma, 3 (30%) foram considerados corretos com uma imagem, e 7 (70%) necessitaram de aquisição de nova imagem ou imagens.

Dos 11 olhos com uveíte, 6 (54,5%) foram considerados corretos com uma imagem, e 5 (45,5%) necessitaram de aquisição de nova imagem ou imagens.

A Tabela 4 demonstra a freqüência dos pacientes por situação endotelial, na indicação da microscopia especular, com o número de casos e respectiva freqüência de exames estatisticamente corretos com uma imagem e exames estatisticamente corretos com mais de uma imagem endotelial.

Tabela 4 - Freqüência dos pacientes por indicação do exame de microscopia especular de córnea (Brasília, 2006)

	Corretos com uma imagem	Corretos com mais de uma imagem	Amostra total
Normais	78 (56%)	61 (44%)	139 (46%)
Lentes de contato	44 (45%)	54 (55%)	98 (33%)
Cirurgia	9 (32%)	19 (68%)	28 (10%)
Degenerações	1 (8%)	11 (92%)	12 (4%)
Glaucoma	3 (30%)	7 (70%)	10 (3%)
Uveíte	6 (54%)	5 (46%)	11 (4%)
Total	141 (47%)	157 (53%)	298 (100%)

### **5.2.3 Número de células contadas por exame**

Nos 141 olhos avaliados com uma imagem, o número médio de células contadas foi de  $135 \pm 22$  células.

Nos 143 olhos avaliados com duas imagens, o número médio de células contadas na primeira imagem foi de  $107 \pm 25$  e na amostra final com duas imagens foi de  $212 \pm 55$  células.

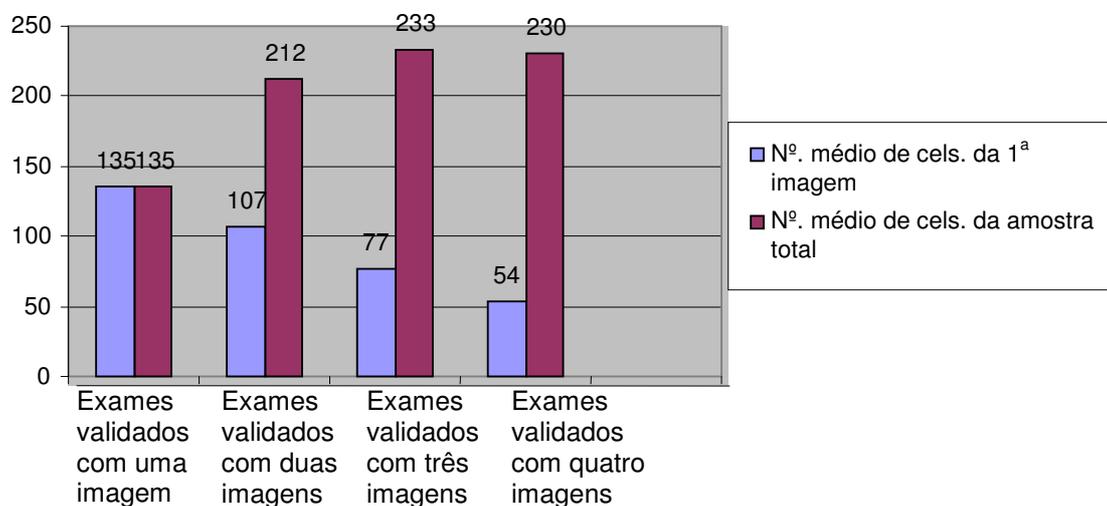
Nos 12 olhos avaliados com três imagens, o número médio de células contadas na primeira imagem foi de  $77 \pm 23$  e na amostra final com três imagens foi de  $233 \pm 74$  células.

Nos dois olhos avaliados com quatro imagens, o número médio de células contadas na primeira imagem foi de  $54 \pm 14$  e na amostra final com quatro imagens foi de  $230 \pm 7$  células.  
(Tabela 5, Gráfico 3)

Tabela 5 - Número de casos e células na primeira imagem e na amostra total validados com 1, 2, 3 ou 4 imagens (Brasília, 2006)

Número de imagens para validar exame	Número de olhos estudados	Número médio de células na primeira imagem	Número médio de células na amostra total
1	141 (47,3%)	$135 \pm 22$	$135 \pm 22$
2	143 (48%)	$107 \pm 25$	$212 \pm 55$
3	12 (4%)	$77 \pm 23$	$233 \pm 74$
4	2 (0,7%)	$54 \pm 14$	$230 \pm 7$

Gráfico 3 - Número de células na primeira imagem e na amostra total validados com 1, 2, 3 ou 4 imagens (Brasília, 2006)



### 5.3 Dados amostrais representativos dos grupos estudados

#### 5.3.1 Grupo 1 - Exames validados com uma imagem

##### 5.3.1.1 Número de Células Contadas

Nos olhos validados com uma imagem, o número mínimo de células contadas foi de 32 e o máximo de 176, com média de  $135 \pm 22$  células. (Tabela 6)

##### 5.3.1.2 Área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ )

Nos olhos validados com uma imagem, a área da amostra endotelial mínima foi de  $20.874 \mu\text{m}^2$  e a máxima de  $86.798 \mu\text{m}^2$ , com média de  $43.557 \pm 5.596 \mu\text{m}^2$ . (Tabela 6)

##### 5.3.1.3 Equivalência em $\text{mm}^2$ da área endotelial avaliada

Nos olhos validados com uma imagem, o mínimo valor da equivalência foi de  $0,14 \times 0,14 \text{ mm}^2$  e o máximo foi de  $0,29 \times 0,29 \text{ mm}^2$ .

#### 5.3.1.4 Erro amostral ou erro relativo calculado

Nos 141 olhos analisados sob orientação do *Cells Analyzer PAT. REC.* com uma imagem, o valor do erro relativo mínimo encontrado foi 3% e do máximo foi de 4,99% e a média encontrada foi de  $4,33 \pm 0,44$ . (Tabela 6)

Tabela 6 - Dados amostrais dos exames concluídos com uma imagem endotelial (Brasília, 2006)

Variável	Número de células contadas	Área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ )	Erro amostral (erro relativo calculado)
Exames concluídos com uma imagem	$135 \pm 22$	$43.557 \pm 5.596$	$4,3 \pm 0,4$

### **5.3.2 Grupo 2 - Exames validados com mais de uma imagem**

#### **5.3.2.1 Grupo 2 A – Dados amostrais referentes à primeira imagem**

**(amostra rotineira, parcial ou incompleta)**

##### **5.3.2.1.1 Número de células contadas**

Nas 157 imagens iniciais que compõem o grupo 2 A, o número mínimo de células contadas foi de 43 e o máximo de 176, com média de  $104 \pm 27$  células. (Tabela 7)

#### 5.3.2.1.2 Área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ )

Nas 157 imagens iniciais que compõem o grupo 2 A, a área da amostra endotelial mínima foi de  $4.060 \mu\text{m}^2$  e a maior de  $46.336,2 \mu\text{m}^2$ , com média de  $40.046 \pm 5.918 \mu\text{m}^2$ .

(Tabela 7)

#### 5.3.2.1.3 Equivalência em $\text{mm}^2$ da área endotelial avaliada

Nas 157 imagens iniciais que compõem o grupo 2 A, o menor valor de equivalência foi de  $0,16 \times 0,16 \text{ mm}^2$  e o maior de  $0,22 \times 0,22 \text{ mm}^2$ .

#### 5.3.2.1.4 Erro amostral ou erro relativo calculado

Nas 157 imagens iniciais que compõem o grupo 2 A, o mínimo erro relativo calculado foi de 5 e o maior de 10, com média de  $6 \pm 1$ . (Tabela 7)

Tabela 7 - Dados amostrais dos exames concluídos no grupo 2 A (Brasília, 2006)

Variável	Número de células contadas	Área endotelial avaliada	Erro amostral
Exames concluídos com uma imagem	$104 \pm 27$	$40.046 \pm 5.918$	$6 \pm 1$

### 5.3.2.2 Grupo 2 B- Dados amostrais referentes às amostras estatisticamente corretas - amostras completas sob orientação do *Cells Analyzer* PAT. REC.

#### 5.3.2.2.1 Número de Células Contadas

Nas 157 imagens que compõem o grupo 2 B, o número mínimo de células contadas, na amostra endotelial completa, foi de 54 e o máximo de 344, com média de  $214 \pm 54$  células. (Tabela 8)

#### 5.3.2.2.2 Área endotelial avaliada em $\mu\text{m}^2$

Nos 157 exames que compõem o grupo 2 B (amostra endotelial completa), a área da amostra endotelial mínima foi de  $43.778 \mu\text{m}^2$  e a da máxima foi de  $171.536 \mu\text{m}^2$ , com média de  $83.316 \pm 17.455 \mu\text{m}^2$ . (Tabela 8)

#### 5.3.2.2.3 Equivalência em $\text{mm}^2$ da área endotelial avaliada

Nos 157 exames que compõem o grupo 2 B (amostra endotelial completa), o menor valor de equivalência foi de  $0,21 \times 0,21 \text{ mm}^2$  e o maior de  $0,41 \times 0,41 \text{ mm}^2$ .

#### 5.3.2.2.4 Erro amostral ou erro relativo calculado

Nos 157 exames que compõem o grupo 2 B (amostra endotelial completa), o mínimo erro relativo calculado foi de 3,2 e o maior de 4,9, com média de  $3,9 \pm 0,56$ . (Tabela 8)

Tabela 8 - Dados amostrais dos exames concluídos no grupo 2 B (Brasília, 2006)

Variável	Número de células contadas	Área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ )	Erro amostral (erro relativo calculado)
Exames concluídos com uma imagem	$214 \pm 54$	$83.316 \pm 17455$	$3,9 \pm 0,56$

## 5.4 Comparações realizadas dos dados amostrais

### 5.4.1 Comparação 1

Compararam-se os seguintes dados amostrais: número de células contadas, área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ ), equivalência ( $\text{mm}^2$ ) e erro amostral (erro relativo calculado) entre os grupos 1 X 2 A.

#### 5.4.1.1 Número de células contadas

O número médio de células contadas no grupo 1 foi de  $135 \pm 22$  e no grupo 2 A de  $103 \pm 28$  células.

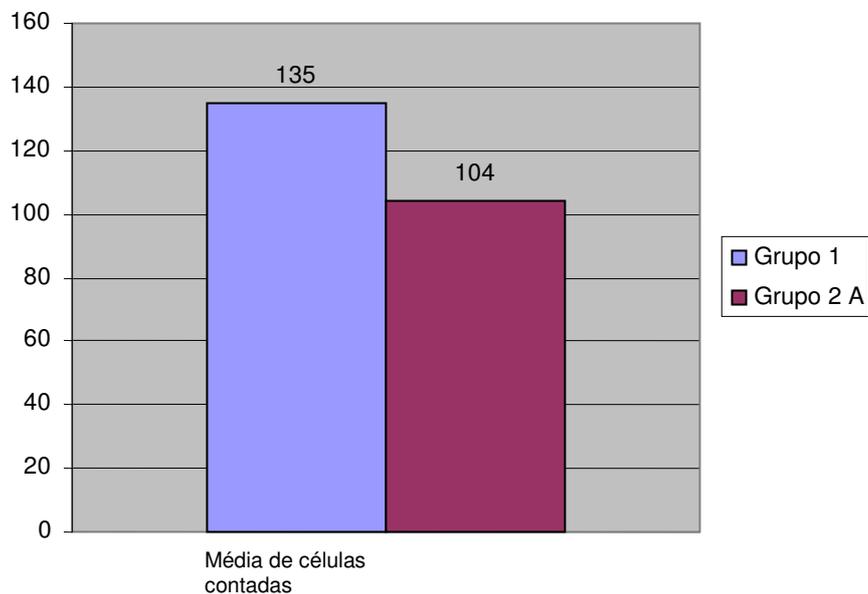
A comparação da média do número de células contadas entre os grupos 1 e 2 A, pelo teste t - Student bi-caudal para amostras não pareadas, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com  $p < 0,01$ . (Tabela 9, Gráfico 4)

Tabela 9 - Análise estatística do número de células consideradas entre os grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 1	Grupo 2 A	P bi-caudal
Número de células contadas	$135 \pm 22$	$104 \pm 27$	$8 \times 10^{-28}$

(Teste t - Student)

Gráfico 4 - Média do número de células contadas nas amostras endoteliais, nos grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)



#### 5.4.1.2 Área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ )

A média da área endotelial avaliada no grupo 1 foi de  $43.557 \pm 5.596 \mu\text{m}^2$ , e no grupo 2 A foi de  $40.046 \pm 5.918 \mu\text{m}^2$ .

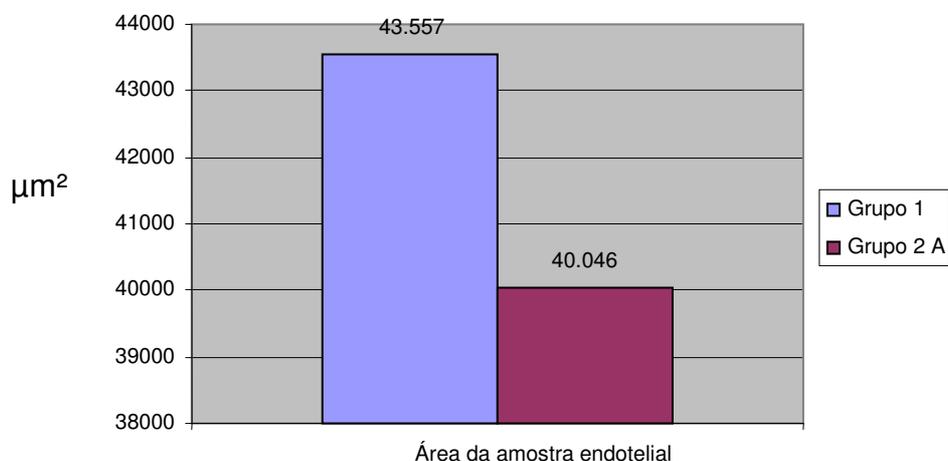
A comparação da média da área das amostras endoteliais entre os grupos 1 e 2 A, pelo teste de t – Student bi-caudal com amostras despareadas, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos  $p < 0,01$ . (Tabela 10, Gráfico 5)

Tabela 10 - Análise estatística das áreas das amostras endoteliais consideradas entre os grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 1	Grupo 2 A	P bi-caudal
Área da amostra endotelial ( $\mu\text{m}^2$ )	$43.557 \pm 5.596$	$40.046 \pm 5.918$	$1,1 \times 10^{-22}$

(Teste t - Student)

Gráfico 5 - Área média das amostras endoteliais nos grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)



#### 5.4.1.3 Erro amostral ou erro relativo calculado

A média do erro amostral no grupo 1 foi de  $4,3 \pm 0,44$  e no grupo 2 de  $6 \pm 1$ .

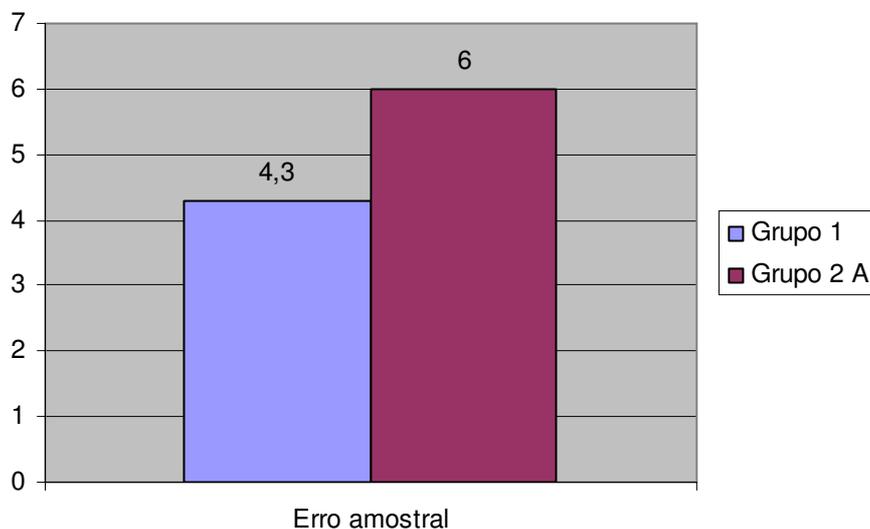
A comparação dos erros relativos entre os grupos 1 e 2 A, pelo teste de t – Student bi-caudal com amostras despareadas, apresentou diferença significativa entre os grupos com  $p < 0,01$ . (Tabela 11, Gráfico 6)

Tabela 11 - Análise estatística do erro amostral entre os grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 1	Grupo 2 A	P bi-caudal
Erro amostral	$4,3 \pm 0,44$	$6 \pm 1$	$6,6 \times 10^{-44}$

(Teste t - Student)

Gráfico 6 - Erro amostral entre os grupos 1 e 2 A (Brasília, 2006)



#### **5.4.2 Comparação 2**

Os resultados a seguir apresentados referem-se à comparação entre o Grupo 2 A - constituído pelos dados amostrais da primeira imagem endotelial captada pelo microscópio especular e Grupo 2 B - constituído pelos dados da análise da amostra final.

##### **5.4.2.1 Número de células contadas**

A média do número de células contadas no grupo 2 A foi de  $104 \pm 27$  e a média no grupo 2 B foi de  $214 \pm 54$ .

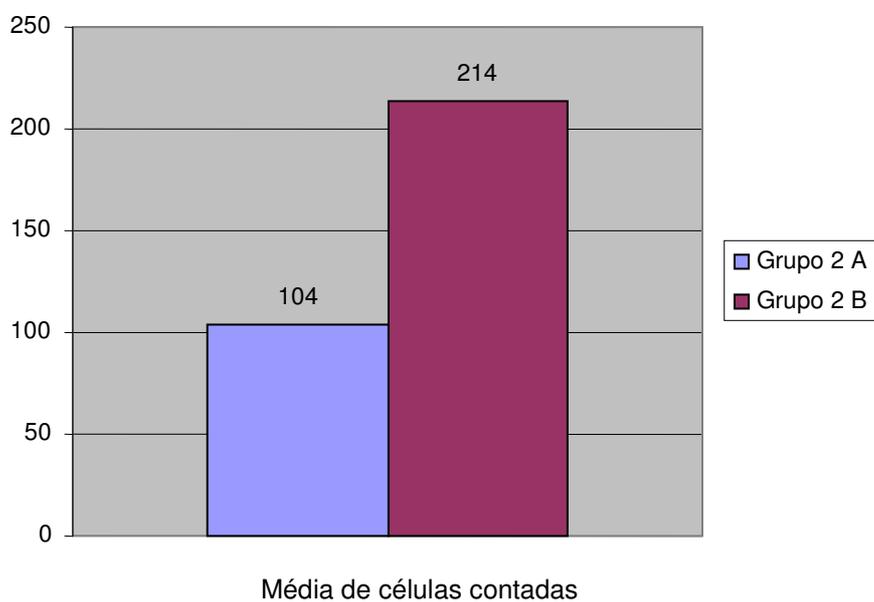
A comparação da média do número de células contadas entre os grupos 2 A e 2 B, pelo teste t - Student bi-caudal para amostras pareadas, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com  $p < 0,01$ . (Tabela 12, Gráfico 7)

Tabela 12 - Análise estatística do número de células consideradas entre os grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 2 A	Grupo 2 B	P bi-caudal
Número de células contadas	104 ± 27	214 ± 54	5 x 10 <sup>-74</sup>

(Teste t - Student)

Gráfico 7 - Média do número de células contadas nas amostras endoteliais dos grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)



#### 5.4.2.2 Área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ )

A média da área endotelial avaliada no grupo 2 A foi de  $40.046 \pm 5.918 \mu\text{m}^2$ , e no grupo 2 B de  $83.316 \pm 17.455 \mu\text{m}^2$ .

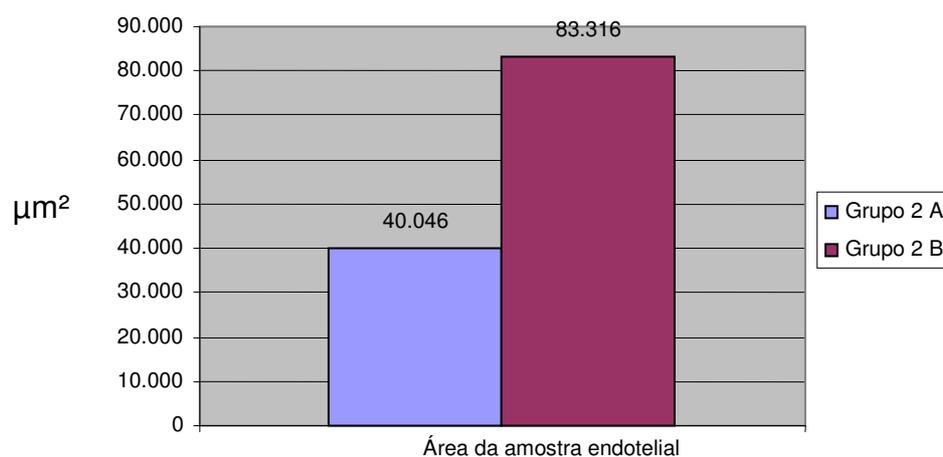
A comparação da média da área das amostras endoteliais entre os grupos 2 A e 2 B, pelo teste de t – Student bi-caudal com amostras pareadas, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos  $p < 0,01$ . (Tabela 13, Gráfico 8)

Tabela 13 - Análise estatística da área da amostras endoteliais consideradas entre os grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 2 A	Grupo 2 B	P bi-caudal
Área da amostra endotelial ( $\mu\text{m}^2$ )	40.046 $\pm$ 5.918	83.316 $\pm$ 17.455	$8 \times 10^{-69}$

(Teste t - Student)

Gráfico 8 - Área média das amostras endoteliais nos grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)



### 5.4.2.3 Erro amostral ou erro relativo calculado

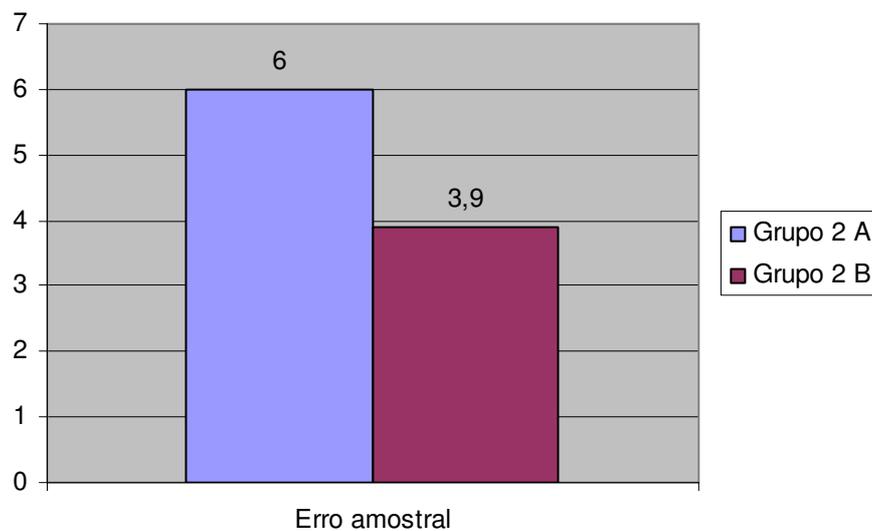
A média do erro amostral no grupo 2 A foi de  $6 \pm 1$ , e no grupo 2 B de  $3,9 \pm 0,56$ . A comparação dos erros relativos entre os grupos 2 A e 2 B, pelo teste de t – Student bi-caudal com amostras pareadas apresentou diferença significativa entre os grupos com  $p < 0,01$ . (Tabela 14, Gráfico 9)

Tabela 14 - Análise estatística do erro amostral entre os grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 2 A	Grupo 2 B	P bi-caudal
Erro amostral	$6 \pm 1$	$3,9 \pm 0,56$	$1 \times 10^{-62}$

(Teste t - Student)

Gráfico 9 - Erro amostral entre os grupos 2 A e 2 B (Brasília, 2006)



### **5.4.3 Comparação 3**

Foi realizada uma comparação dos dados amostrais: número de células contadas, área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ ), equivalência ( $\text{mm}^2$ ) e erro amostral ou erro relativo calculado entre os grupos 1 X 2 B.

#### **5.4.3.1 Número de células contadas**

A média do número de células contadas no grupo 1 foi de  $135 \pm 22$ , e a do grupo 2 B foi de  $214 \pm 54$ .

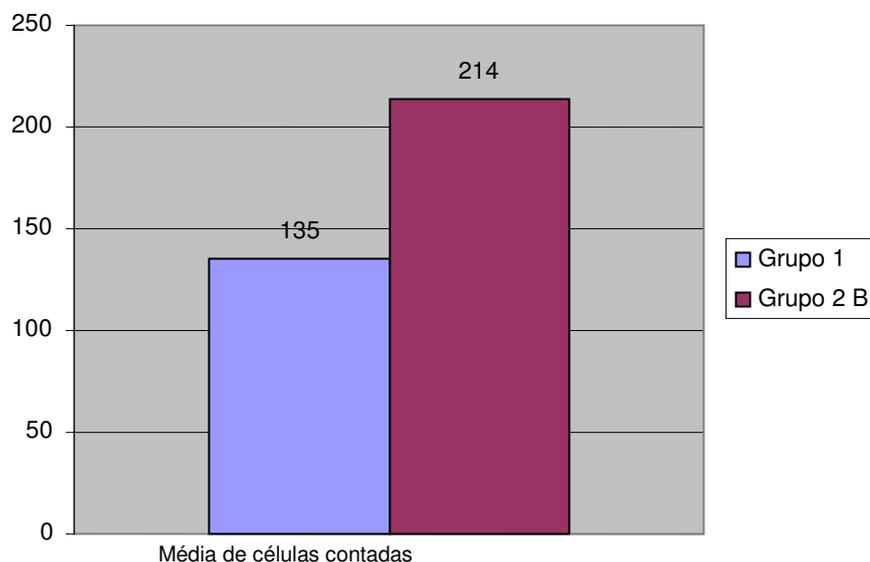
A comparação da média do número de células contadas entre os grupos 1 e 2 B, pelo teste t - Student bi-caudal para amostras não pareadas, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com  $p < 0,01$ . (Tabela 15, Gráfico 10)

Tabela 15 - Análise estatística do número de células consideradas entre os grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 1	Grupo 2 B	P bi-caudal
Número de células contadas	$135 \pm 22$	$214 \pm 54$	$1,7 \times 10^{-42}$

(Teste t - Student)

Gráfico 10 - Média do número de células contadas nas amostras endoteliais nos grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)



#### 5.4.3.2 Área endotelial avaliada ( $\mu\text{m}^2$ )

A média da área endotelial avaliada no grupo 1 foi de  $43.557 \pm 5.596 \mu\text{m}^2$ , e no grupo 2 B de  $83.316 \pm 17.455 \mu\text{m}^2$ .

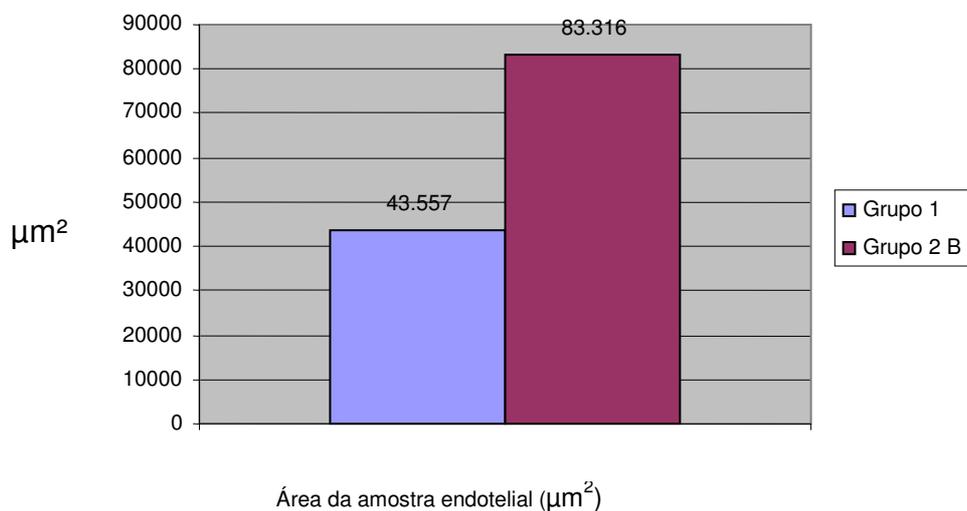
A comparação da média da área das amostras endoteliais entre os grupos 1 e 2 B, pelo teste de t – Student bi-caudal com amostras não pareadas, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com  $p < 0,01$  (Tabela 16, Gráfico 11).

Tabela 16 - Análise estatística da área das amostras endoteliais consideradas entre os grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 1	Grupo 2 B	P bi-caudal
Área da amostra endotelial ( $\mu\text{m}^2$ )	$43.557 \pm 5.596$	$83.316 \pm 17.455$	$1,4 \times 10^{-37}$

(Teste t - Student)

Gráfico 11 - Área média das amostras endoteliais nos grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)



#### 5.4.3.4 - Erro amostral ou erro relativo calculado

A média do erro amostral no grupo 1 foi de  $4,3 \pm 0,44$ , e no grupo 2 B foi de  $3,9 \pm 0,56$ .

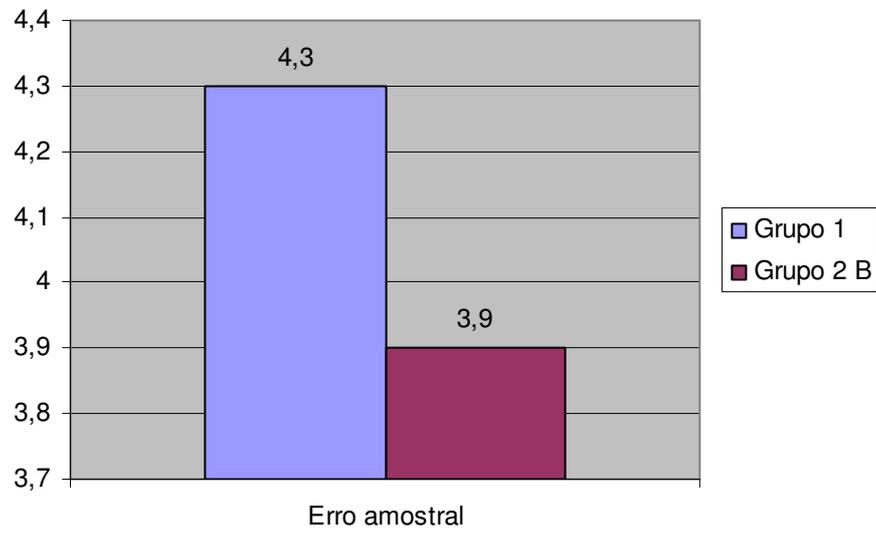
A comparação dos erros relativos entre os grupos 1 e 2 B, pelo teste de t – Student bi-caudal com amostras não pareadas, apresentou diferença significativa entre os grupos com  $p < 0,01$  (Tabela 17, Gráfico 12).

Tabela 17 - Análise estatística do erro amostral entre os grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 1	Grupo 2 B	P bi-caudal
Erro amostral	$4,3 \pm 0,44$	$3,9 \pm 0,56$	$5 \times 10^{-9}$

(Teste t - Student)

Gráfico 12 - Erro amostral entre os grupos 1 e 2 B (Brasília, 2006)



## 6 DISCUSSÃO

## 6.1 Metodologia

A escolha do tema desta pesquisa deve-se à observância, nos eventos científicos e na clínica diária, de inúmeras aplicações da microscopia especular de córnea, associados ao interesse de se conhecer a qualidade dos dados amostrais obtidos dos exames de microscopia especular.

O advento da microscopia especular por Maurice (1968), os aperfeiçoamentos que se seguiram, por Laing et al. (1975), permitiram a execução de exames *in vivo* com registro fotográfico do mosaico endotelial. Bourne & Kaufman (1976) introduziram melhoramentos na técnica da microscopia especular *in vivo*, permitindo melhor resolução das imagens obtidas - fotografia do tecido e realização de contagem celular.

Os recursos de automatização tornaram a captação de imagens do endotélio da córnea muito simples, e os *softwares* a semiologia do endotélio muito prática. O exame é atualmente acessível, não invasivo e com amplas indicações na prática clínica diária. (Siertsema et al. 1993)

Porém todo esse desenvolvimento e praticidade não foram de encontro à reprodutibilidade e à confiabilidade do exame, pois se tornaram comuns casos em que havia flutuações dos resultados entre exames de um mesmo paciente, em diferentes momentos. (Hirst, 1980)

O *Cells Analyzer PAT. REC.* vislumbra um novo patamar de confiabilidade para o exame de MEC, pois este software realiza o trabalho de laboratório estatístico desenvolvido para análise do tamanho da amostra endotelial necessária para que cada caso estudado adquira confiabilidade estatística à luz do poder estatístico amostral aceito pela ciência médica na literatura pesquisada, além de auxiliar na análise dos dados semiológicos endoteliais mensurados em relação a valores representativos de normalidade para a faixa etária do paciente em exame. (Abib, 2006)

É sabido que para o exame de microscopia especular de córnea adquirir validade estatística, seu resultado deve representar a realidade do mosaico endotelial da córnea, tendo erro amostral aceito pela ciência médica contemporânea (Abib, 2006). A inexistência de relatos científicos sobre o erro amostral em exames de microscopia especular já realizados também é um dos fatores motivadores do estudo.

Waring III et al. (1982) afirmaram que a microscopia especular é um recurso importante para o estudo da morfologia endotelial, o que foi confirmado pela Academia Americana de Oftalmologia (AAO, 1997) e corroborado por outros autores, tais como Glasser et al. (1985), Kim et al. (1998).

Entretanto, mesmo com o desenvolvimento tecnológico, Hirst (1980) e Abib (2006) apontaram dificuldades, ou seja, questionamentos básicos, que permanecem sem respostas a serem elucidadas, para que o exame adquira confiabilidade e reprodutibilidade. O desenvolvimento de um novo software, que calcula o erro relativo, indicando o número de células e o tamanho da amostra, tornando o exame da microscopia especular de córnea reprodutível e padronizada, despertou o interesse para a realização de um estudo comparativo das amostras endoteliais com e sem a intervenção do software.

A escolha dos autores pelo modelo de estudo transversal deveu-se à objetividade e à facilidade na coleta dos dados, obtendo-se, com isso, resultados de fácil interpretação para obtenção de amostras representativas da população estudada e para descrição das características dos eventos na população. (Fletcher, 1996; Pereira, 2000)

Optou-se por estudar, de forma consecutiva, todos os casos de microscopia especular de córnea, realizados em determinado período, pois desta forma a rotina metodológica do estudo será aplicada à rotina da realização do exame em serviço de córnea, para demonstrar o perfil das amostras endoteliais examinadas pela microscopia especular.

A inclusão de casos foi baseada na boa qualidade das imagens e na existência destas em número suficiente para que a metodologia preconizada pelo *Cells Analyzer PAT. REC.*,

pudesse ser aplicada. Os casos com diminuição da transparência corneal que prejudicassem a qualidade das imagens endoteliais foram excluídos, representados por cicatrizes e edema de córnea. De igual forma, excluídos do estudo os casos de doenças endoteliais que cursem com ausência de células endoteliais em determinada área ou áreas do mosaico endotelial, diminuindo a população de células endoteliais existentes na superfície posterior da córnea, pois não se dispõe, até o momento, de método diagnóstico não invasivo para quantificar a superfície endotelial afetada por doença com este comportamento, tais como córnea “guttata”, distrofia endotelial de Fuchs, distrofia polimorfa posterior, síndrome endotelial-írido-corneal.

A amostra considerou olhos direito e esquerdo, pois, pela natureza unilateral de determinadas condições clínicas ou cirúrgicas, existem justificativas para diferenças endoteliais entre os olhos. O elevado número de olhos estudados é fator positivo para que se possa estudar amostra com tal heterogeneidade.

A idade dos pacientes, cujos exames foram realizados, variou da segunda à nona década de vida, evidenciando a heterogeneidade etária. Fato que reforça a necessidade de auxílio informatizado para cálculo do tamanho amostral para a microscopia especular de córnea. Bourne, Kaufman (1976) encontraram decréscimo significativo do número de células endoteliais com a idade; Abib (2000) além de encontrarem decréscimo significativo do número de células endoteliais com a idade, também demonstraram que, para pessoas de uma mesma idade, existem, em condições de normalidade, diferentes valores de densidade endotelial. O *Cells Analyzer PAT. REC.*, por considerar este padrão de variabilidade endotelial inerente à idade, é capaz de calcular o tamanho da amostra endotelial específica, individualizando o exame.

Outro fator que denota a heterogeneidade da amostra dos exames endoteliais é a diversidade de estado dos mosaicos endoteliais estudados, tais como: normal, com sofrimento secundário ao uso de lentes de contato, alterações inerentes a cirurgias intra-oculares, degenerações endoteliais, glaucoma e uveíte. Nestas condições clínicas, coexistem densidades normal ou diminuída, área celular normal ou aumentada, polimegatismo normal ou

aumentado, pleomorfismo normal ou aumentado, associados ou isolados, mas presente nas córneas examinadas, o que representa a realidade da rotina do exame. (Laing et al., 1979)

## 6.2 Microscopia especular de córnea

Os exames de microscopia especular de córnea foram realizados com microscópio especular de alta ampliação, semi-automatizado e de contato. Segundo Waring III et al. (1982), o microscópio especular de contato obtém imagens com boa resolução, entretanto a manipulação da córnea pode induzir artefatos e uma menor tolerância ao exame pelo paciente. Este tipo de aparelho pode captar grande número de diferentes imagens com facilidade, basta, para tal, deslizar a objetiva sobre a superfície da córnea. Já o microscópio especular de não-contato é mais tolerado pelo paciente, pois possui grande aumento, mas com menor resolução que os microscópios especulares de contato. Este tipo de aparelho pode captar, com dificuldade, limitado número de imagens endoteliais devido ao mecanismo de autofocalização e autocentragem existente nos modelos atuais. Este automatismo facilita a aquisição da imagem, mas tende a limitar o número desta.

A escolha do microscópio de contato da marca *Bio-Optics®* para a pesquisa ocorreu por se tratar do padrão ouro, o mais utilizado em pesquisas. (Laing et al., 1983; Neubauer et al., 1984; Diaz-Valle et al., 1998; Alves, 2001)

A técnica de realização do exame foi baseada na literatura com captação de imagens do disco central da córnea, que possui como limite a média periferia corneal. Esta sistemática melhora a representatividade do exame, como demonstrado por Rao et al. (1978).

Todos os exames foram realizados pelos mesmos pesquisadores, treinados na aquisição e no processamento das imagens endoteliais para obtenção dos dados da semiologia em estudo. A metodologia de marcação dos centros celulares foi realizada por um único operador experiente. Phillips et al. (2005) afirmaram que esta técnica produz resultados

mais fidedignos quando comparada às técnicas dos retículos fixo e móvel. Importante para tal precisão é que todas as células sejam cuidadosamente marcadas.

Para a determinação do erro amostral existente em uma imagem já processada pelo microscópio especular ou mesmo para calcular o tamanho da amostra endotelial, número de células a serem contadas, o *Cells Analyzer PAT. REC.* utiliza grau de confiança que pode variar de 90 a 99%, para tanto se optou por 95% por ser aceito pela ciência médica e por ser tecnicamente viável. O erro relativo do estudo foi o utilizado para este grau de confiança (5%). (Abib, 2006)

Em relação à situação do mosaico endotelial, na indicação do exame de microscopia especular, aproximadamente metade dos exames realizados foram considerados normais. Neste grupo estão incluídos exames pré-operatórios para cirurgias de catarata, o que eleva consideravelmente o número de olhos com endotélio considerados normais. A microscopia especular no pré-operatório de catarata é exame aceito como rotina na detecção do risco corneal. (Oshika et al., 1998; Stumpt, 2000; Pereira, 2004)

Os dados semiológicos da primeira imagem endotelial demonstraram a heterogeneidade amostral existente no endotélio das córneas examinadas, pois se nota grande variação da densidade endotelial (859 a 4.078 células/mm<sup>2</sup>) e da área celular média (245 a 1.164  $\mu\text{m}^2$ ), do polimegatismo (coeficiente de variação de 0,19 a 0,507) e do pleomorfismo (hexagonalidade celular de 20% a 81,9%).

Em situações de anormalidade existe maior necessidade de imagens complementares. Considerando-se que o tamanho do campo endotelial captado pelo microscópio especular não é variável, se as células endoteliais forem pequenas um grande número delas poderá estar incluído em uma única imagem. À medida que o tamanho das células endoteliais aumenta o número de células contidas no mesmo tamanho de campo serão menores, dessa forma imagens complementares far-se-ão necessárias. Isso justifica a necessidade de mais de uma

imagem endotelial principalmente nos casos em que o tamanho celular é maior (densidade endotelial menor). (Price, Cheng, 1981; Siertsema et al., 1993)

Outra justificativa para a necessidade de aumentar o número de imagens endoteliais no processo de amostragem de suas células é o aumento da variabilidade da morfologia das células existentes no mosaico em exame, pois, quanto mais homogêneo for o tamanho das células endoteliais menor será o da amostra, quanto mais heterogêneo for o tamanho das células endoteliais maior deverá ser o da amostra, ou seja, maior o número de células a serem contadas a fim de tornar a amostra representativa. (Hirst, 1980)

Segundo Laule et al. (1978); Mishima (1982) e Waring III et al. (1982) a população de células tende a decrescer com a idade, aumentando a heterogeneidade da morfologia de suas células; isso evidencia quão complexa pode ser a determinação do tamanho da amostra endotelial, número de células a serem contadas, para que a amostragem endotelial incluída no exame obtenha a representatividade do mosaico endotelial examinado à luz da técnica amostral estatisticamente aceita pela medicina, com erro estatisticamente tolerado (inferior a 5%).

O *Cells Analyzer PAT. REC.*, por ser um laboratório estatístico voltado para o cálculo do erro amostral e do tamanho das amostras endoteliais a serem consideradas, torna-se recurso extremamente importante para que se conheça o erro existente em um exame realizado, tornando possível a distinção entre os exames representativos ou não da realidade do mosaico endotelial (Abib, 2006). A metodologia empregada demonstrou como o *Cells Analyzer PAT. REC* é efetivo nesta separação.

Dos 298 olhos examinados, 141 (47%) necessitaram de apenas uma imagem para fornecer o número suficiente de células necessárias para validar o exame, dos 157 restantes (53%) fez-se necessário aumentar o número de imagens consideradas e o número de células contadas para que o erro amostral passasse a ser estatisticamente tolerado. Estes resultados

demonstraram que, se o erro relativo não fosse calculado, mais da metade dos exames teriam amostras não representativas da realidade do mosaico endotelial.

Sobre o número de células contadas por exame, alguns tópicos devem ser comentados. Toda vez que se pretende utilizar um determinado número de células endoteliais para determinar erro amostral, a área das células contadas deve ser conhecida. Dessa forma, o número de células consideradas na amostragem deve ter sido circundado por uma linha externa de células marcadas, pois este é o método empregado pelo *software Bambi 2000 Plus®*, bem como pelo *software* de vários modelos de microscópio especular da *Konan*. (Vecchi et al., 1996)

Uma vez que o estudo calculou 135 células como número médio de células contadas no grupo 1, é correto afirmar que o número de células marcadas por imagem foi em torno de 30% acima deste valor. Não se fez menção, na literatura pesquisada, à quantidade de células endoteliais desconsideradas da contagem pelos softwares utilizados, mas não desnecessárias, pois os limites internos destas determinam os limites externos das circunscritas por essa linha de células. Estudos para determinar a quantidade de células desconsideradas por essa metodologia de marcação celular devem ser realizados.

Evidenciou-se que o número médio de células endoteliais contadas na primeira imagem, de exames com diferentes números de imagens necessárias para validá-lo, diminuiu à medida que aumentou o número de imagens necessárias, o que demonstra que quanto menor o número de células contadas por imagem maior será a necessidade de imagens endoteliais complementares. Isto pode ocorrer pelo aumento da área celular ou da diminuição da densidade endotelial.

Uma das dificuldades em se imaginar a dimensão do mosaico endotelial examinado ocorre, pois poucos microscópios especulares apresentam a área total ocupada pela amostragem endotelial, seja em quantas imagens e quantas células forem necessárias. Para dificultar este dado é demonstrado em  $\mu\text{m}^2$ . O *Cells Analyzer PAT. REC.* transforma esta área

estimada em  $\mu\text{m}^2$  para a equivalente em  $\text{mm}^2$ . No grupo 1 a superfície média do mosaico avaliada variou de  $0,14 \times 0,14 \text{ mm}^2$  a  $0,29 \times 0,29 \text{ mm}^2$ ; no grupo 2 A variou de  $0,16 \times 0,16 \text{ mm}^2$  a  $0,22 \times 0,22 \text{ mm}^2$ , e no grupo 2 B variou de  $0,21 \times 0,21 \text{ mm}^2$  a  $0,41 \times 0,41 \text{ mm}^2$ .

Quanto ao erro amostral representado no estudo pelo erro relativo calculado, em todos os exames realizados que compuseram o grupo 1, foi inferior a 5% tendo como média  $4,33 \pm 0,44$ . É condição, para que a amostragem seja representativa da realidade do mosaico endotelial, o erro relativo calculado tornar-se inferior ao planejado, se isso não ocorrer existe a necessidade de aumentar-se a amostragem. Caso não aumente, o intervalo de confiança da variável mensurada será maior do planejado.

No grupo 2 A o erro amostral variou de 5,1% a 11%, com média de  $6 \pm 1,8$ . Este erro amostral, por ser superior ao do planejado, ou seja, 5%, indica que novas imagens, sempre distintas das anteriores, deverão ser consideradas no processo de amostragem endotelial. Após a complementação da amostra, com a obtenção das amostras endoteliais e número de células específicos para cada caso, respeitando-se o indicado pelo *Cells Analyzer PAT. REC.* e a metodologia anteriormente descrita, o erro amostral no grupo 2 B variou de 3,2 a 4,9, com média de  $3,9 \pm 0,56$ .

### **6.3 Comparações realizadas entre os grupos estudados**

As comparações a seguir comentadas utilizaram dados das amostras endoteliais partindo da hipótese nula, de que não existem diferenças entre os dados amostrais calculados pelo *Cells Analyzer PAT. REC.* a partir dos dados da semiologia endotelial das imagens do mosaico endotelial processadas pelo *software Bambi 2000 Plus®*.

#### **6.3.1 Comparação 1**

Nesta, por indicação do *Cells Analyzer PAT. REC.*, os dados amostrais dos exames do Grupo 1 são comparados com os dados amostrais do Grupo 2 A. Evidenciou-se diferença

estatisticamente significativa entre os grupos comparados, rejeitando-se a hipótese nula para todos os dados amostrais comparados.

### **6.3.2 Comparação 2**

Nesta, os dados amostrais dos exames do Grupo 2 A, por falta de células endoteliais na amostra, foram comparados com os dados amostrais dos mesmos exames após a complementação amostral indicada pelo *Cells Analyzer PAT. REC* (Grupo 2 B). Evidenciou-se diferença estatisticamente significativa entre os exames incompletos quando comparados com seus respectivos resultados finais, considerados completos – com número adequado de células - rejeitando-se a hipótese nula para todos os dados amostrais comparados.

### **6.3.3 Comparação 3**

Nesta, por indicação do *Cells Analyzer PAT. REC*, os dados amostrais dos exames do Grupo 1 foram comparados com os do Grupo 2 B, evidenciando-se, assim, diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparados. Rejeitou-se a hipótese nula para todos os dados amostrais comparados.

A metodologia utilizada procurou evidenciar diferença entre o exame de microscopia especular incompleto, com uma única imagem endotelial e o exame completo, com tantas imagens e células quantas necessárias, considerando-se a imagem inicial como parte da amostra completa, ou seja, a evidência das diferenças entre dados amostrais de exames realizados de forma incompleta com o resultado final dos mesmos exames após complementação. O desenho do presente estudo não deve ser confundido com o estudo comparativo de exame incompleto com exame completo que somente utiliza imagens endoteliais distintas das que gerou o exame incompleto.

Fica clara a existência de diferença estatística entre os dados das amostras endoteliais dos exames de microscopia especular de córnea, quando comparadas às amostras endoteliais de uma única imagem endotelial, com amostras endoteliais obtidas sob orientação de *software*

específico, com tantas células e imagens quantas indicadas por este, porque as comparações realizadas demonstraram resultados estatisticamente inquestionáveis, pois o valor de  $p$  calculado tende a zero.

O *software Cells Analyzer PAT. REC* foi objetivo em orientar a determinação do tamanho das amostras endoteliais e em calcular o erro amostral nos exames de microscopia especular. Ficou demonstrada sua importância na rotina do exame endotelial para que se realizem exames com representatividade e reprodutibilidade.

Sugere-se, como forma de padronização, que o cálculo do tamanho amostral e a determinação de erro amostral sejam utilizados de forma rotineira nos serviços que dispõem de microscópio especular de córnea.

## **7 CONCLUSÕES**

**Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:**

1- Após o estudo das imagens endoteliais da córnea, obtidas pela microscopia especular, comprovou-se diferença estatística entre os dados amostrais (número de células e da área das amostras endoteliais e erro amostral) dos exames de microscopia especular, quando comparadas amostras endoteliais de uma única imagem, com amostras obtidas sob orientação de *software* específico, com tantas células e imagens quantas indicadas por este.

2 - As três comparações demonstraram que os grupos apresentam perfis amostrais distintos, porém, dentre os grupos estudados - Grupo 1, Grupo 2 A e Grupo 2 B – existe, para cada um deles, perfil de homogeneidade amostral evidenciado pelo resultado da análise estatística empregada a partir de dados amostrais calculados pelo *Cells Analyzer PAT. REC.* na amostra composta pelos 298 exames endoteliais estudados.

3 - O estudo dos dados amostrais, sem e com a intervenção do *Cells Analyzer PAT. REC.*, mostrou-se estatisticamente diferente, com amostras maiores e erros amostrais menores após a intervenção do *software Cells Analyzer PAT. REC.*

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abib FC. Estudo do endotélio corneano em portadores de diabetes mellitus tipo II por microscopia especular de córnea. [Tese] Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; 1989.
2. Abib FC. Microscopia Especular de Córnea. 1th ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000.
3. Abib FC. Corneal Specular Microscopy with Statistical Reliability and Reproducibility. 2th ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
4. Alanko HI; Airaksinen JA. Counter for fixed-frame endothelial cell analysis. Am J Ophthalmol. 1981; 91(3): 401-3.
5. Alves EAF. Efeito da lidocaína a 1% sem preservativo sobre o endotélio corneano de coelhos. [Tese] Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.
6. Alves MBM, Arruda SM. Como fazer referências (bibliográficas eletrônicas e demais formas de documento). Universidade Federal de Santa Catarina. Biblioteca Universitária. Disponível em: < [www.unb.org.br/biblioteca-central](http://www.unb.org.br/biblioteca-central) > Acesso 1 março 2006.
7. American Academy of Ophthalmology. Anatomy of Cornea. In: Basic and Clinical Science Course. External Disease and Cornea. San Francisco: LEO - Lifelong Education for the Ophthalmologist; 2006. p. 5-12.
8. Bambi 99 Plus. User's manual. Cary: Bio-optics Inc., 2000. (Software)

9. Benetz BAM, Diaconu E, Bowlin SJ, Oak SS, Laing RA, Lass HL. Comparison of corneal endothelial image analysis by Konan SP 8000 noncontact and Bio-Optics Bambi systems. *Cornea*. 1999; 18(1): 67-72.
10. Berquio ES, Souza JMP, Gotlier SLD. *Bioestatística*. São Paulo: EPU, 1981.
11. Binder RF, Binder HF. Regenerative processes in the endothelium of the cornea. *Arc Ophthalmol*. 1957; 57:11-3.
12. Binkhorst CN, Nygaard P, Loones LH. Specular microscopy of the corneal endothelium and lens implant surgery. *Am J Ophthalmol*. 1978; 85(5): 597- 605.
13. Bourne WM, Kaufman HE. Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. *Am J Ophthalmol*. 1976; 81(3): 319-23.
14. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Continued endothelial loss ten years after lens implantation. *Ophthalmology*. 1994; 101: 1014-1022.
15. Capella JA. Regeneration of endothelium in diseased and injured corneas. *Am J Ophthalmol*. 1972; 74(5): 810-817.
16. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo. *Cornea*. 2001; 20(7): 731-37.
17. Diaz-Valle D, Sanchez JMBC, Castilho A, Sayagues O, Moriche M. Endothelial damage with cataract surgery techniques. *J Cataract Refract Surg*. 1998; 24:951-55.

18. 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; 22: 63-71.
19. Doughty MJ. Concerning the symmetry of the 'hexagonal' cells of the corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 1992; 55 (1):145-154.
20. Doughty MJ, Newlander K, Olejnik O. Effect of bicarbonate-free balanced salt solutions on fluid pump and endothelial morphology of rabbit corneas in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 1993; 45(2): 102-109.
21. Edelhauser HF, Hanneken AM, Pederson HJ, Van Horn DL. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Arc Ophthalmol.* 1981; 99:1281-87.
22. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(5): 1755- 67.
23. Fletcher RH. Anormalidade. In: Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia Clínica: elementos essenciais.* 3th ed. Porto Alegre: Artmed; 1996. p: 29-51.
24. Fukami H, Laing RA, Tsubota K, Chiba K, Oak SS. Corneal endothelial changes following minor trauma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29(11): 1677- 82.
25. Geroski DH; Edelhauser HF. Morphometric analysis of the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30( 2):.254-259.
26. Hartmann C, Koditz W. Automated Morphometric endothelial analysis combined with video specular microscopy. *Cornea.* 1984; 3: 155-167.

27. Hirst LW, Ferris FL III, Stark WJ, Fleishman JA. Clinical Specular microscopy. *Ophthalmol Vis Sci.* 1980;19: 2-4.
28. Jackson AJ, Gardiner T, Archer DB. Morphometric analysis of corneal endothelial giant cells in normal and traumatized corneas. *Ophthal and Physiological Optics* 1995;15 (4): 305-310.
29. Jurkunas U, Colby K. Evaluation of corneal endothelium. *Contemp Ophthalmol.* 2005; 4(1): 1-5.
30. Kanski J J. *Oftalmologia Clínica.* 3th ed. Rio de Janeiro: Rio Med Livros; 2002.
31. Kim T, Holley GP, Lee JH, Brooker G, Edelhauser HF. The effects of intraocular lidocaine on the corneal endothelium. *Ophthalmology.* 1998; 105(1):125-130.
32. Koester CJ, Roberts CW, Donn A, Hoefle FB. Wide field specular microscopy: clinical and research applications. *Ophthalmology.* 1980; 81:849-860.
33. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Córnea.* 2th ed. London: Elsevier Mosby; 2005.
34. Kreutziger GO. Lateral membrane morphology and gap junction structure in rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 1976; 23: 285-293.
35. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. *Arc Ophthalmol.* 1975; 97(9):1714-9.
36. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy: qualitative evaluation of corneal endothelial photomicrographs. *Arch Ophthalmol.* 1979; 97:1720-25.

37. Laing RA, Neubauer L, Leibowitz HM, Oak SS. Coalescence of endothelial cell in traumatized cornea. *Archives of Ophthalmology*. 1983; 101(11):1712-15.
38. Landes M, Siertsema G, Van RJJ. Comparative study of three semiautomated specular microscopes. *J Cataract Refract Surg*. 1995; Fairfax, v. 21, p.409-16, July 1995.
39. Larsson LI, Bourne WM, Pach JM, Brubaker RF. Structure and function of the corneal endothelium in diabetes mellitus type I e type II. *Arch Ophthalmol*. 1996; 114: 9- 14.
40. Laule A, Cable MK, Hoffman CE, Hanna C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol*. 1978; 96: 2031-35.
41. Lee JS, Lee JE, Choi HY, Oum BS, Cho BM. Corneal endothelial cell change after phacoemulsification relative to the severity of diabetic retinopathy. *J Cataract Refract Surg*. 2005; 31: 742-49.
42. Leles CR. Princípios de bioestatística. In: Estrela C. *Metodologia Científica - ensino e pesquisa em odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 2001, p. 275-305.
43. Lohman LE, Rao GN, Aguavella JA. Optics and clinical applications of wide-field specular microscopy. *Am J Ophthalmol*. 1981; 92(1): 43- 8.
44. Macrae SM, Matsuda M, Phillips DS. The long-term effects of polymethylmethacrylate contact lens wear on the corneal endothelium. *Ophthalmology*. 1994; 101(2): 365 - 370.
45. 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; 26: 443-49.

46. Maurice DM. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia*. 1968; 24:1094-95.
47. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *Am J Ophthalmol*. 1982; 93(1): 1- 29.
48. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *Ophthalmology*. 1982; 89(6): 525- 530.
49. Moreira CAJ. Hialuronato de sódio como veículo de administração de gentamicina intra-ocular: estudo in vitro e in vivo. [Tese] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina; 1989.
50. Moreira CA. Endotélio corneano: microscopia especular. *Anais de Oftalmol*. 1982; 1(1): 23- 6.
51. Neubauer L, Laing RA, Leibowitz HM. Specular microscopic appearance of damaged and dead endothelial cells in corneas following short-term storage. *Arch Ophthalmol*. 1984; 102: 439- 44.
52. Nishi O, Hanasaki K. Automated determination of polygonality of endothelial cells. *Cornea*. 1989; 8: 54-57.
53. Nishida T. Cornea. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea*. London: Elsevier Mosby; 2005.p.261- 281.
54. Ohno K, Nelson LR, Maclauren J, Hodge DO, Bourne WM. Comparison of recording and systems analysis methods in specular microscopy. *Cornea*. 1999; 18 (4):416-423.

55. Olsen T. Optical principles for estimation of endothelial cell density with non-contact specular microscope. *Acta Ophthalmol.* 1979; 57: 860-867.
56. Oshika T, Kunihiro N, Yaguchi S, Emi K, Takenaka H, Tsuboi S et al. Three year prospective randomized evaluation of intraocular lens implantation through 3.2 and 5.5 mm incisions. *J Cataract Refract Surg.* 1998; 24: 509-14.
57. Ophthalmic Procedure Assessment. Corneal endothelial photography; three-year revision. American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmic Procedure Assessment. Ophthalmology.* 1991; 98 (9):1464-68.
58. Ophthalmic Procedure Assessment. Corneal endothelial photography; three-year revision. American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmic Procedure Assessment. Ophthalmology.* 1997; 104 (8):1360-64.
59. Pereira ACA. Avaliação da energia ultra-sônica e perda de células endoteliais nas técnicas de facoemulsificação stop e chop e nuclear preslice. [Tese] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina; 2004.
60. Pereira MG. *Epidemiologia – Teoria e Prática.* Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2000.
61. Perez-Santoja JJ, Sakla HF, Gobbi F. Corneal endothelial changes after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 1995; 23:177-83.
62. Phillips C, Laing R, Yee R. *Specular Microscopy.* In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea.* London: Elsevier Mosby; 2005.p.261- 281.
63. Price NC, Cheng H. Contact and non-contact specular microscopy. *Br J Ophthalmol.* 1981; 65: 568-574.

64. Rao CN, Shaw EL, Arthur E, Aguavella JV. Morphological appearance of the healing corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*. 1978; 96: 2027-30.
65. Rother EM, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referência. 2th ed. São Paulo, 2005.
66. Santos CN. Toxicidade córneo-conjuntival do colírio de iodo polvidona. [Tese] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina; 2001.
67. Sartori MBCF. Hidroxipropilmetilcelulose como veículo para antibióticoterapia intra-ocular. Estudo "in-vitro" e "in-vivo". [Tese] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo- Escola Paulista de Medicina; 1992.
68. Sas Institute. SAS user`s guide: statistic version 5. Cary: SAS Institute Inc. 1985. (Software)
69. Schor P, Chamon W. Microscopia especular de córnea. *Arq Bras Oftalmol*. 1996; 59(5): 529-31.
70. Siertsema JV, Landesz M, Brom VDH, Rij VG. Automated video image morphometry of corneal endothelium. *Doc Ophthalmol*. 1993; 85: 35-44.
71. Shaefer TM, Abib FC, Barreto JJ. Estudo da morfologia endotelial em usuários de lentes de contato acrílicas. *Arq Bras Oftalmol*. 2002; 65 (2): 239- 42.
72. Srerard ES, Buckley RJ. Contact clinical specular microscopy of corneal endothelial: optical modifications to the applanating objective cone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981; 20(6): 816-820.

73. Stumpt S. Estudo do endotélio corneano em cirurgias de cataratas duras: extração extracapsular planejada da catarata e facoemulsificação. [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina; 2000.
74. Waring III GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium: normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*. 1982; 89(6):531-590.
75. 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; 26 (9): 1191-1201.
76. Yee RW, Matsuda M, Edelhauser H.F. Wide-field endothelial counting panels. *Am J Ophthalmol*. 1986; 99(5): 596-7.
77. Vaikoussis E, Bisogiannis Z, Margaritis L. Corneal endothelial damage after Nd:YAG laser anterior capsulotomy. *Doc Ophthalmol*. 1993; 83(4):279-286.
78. Van Horn DL, Hyndiuk RA. Endothelium wound repair in primate cornea. *Exp Eye Res*. 1975; 21:113-24.
79. Van Horn DL, Sendele DD, Seidman S, Bucu PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977; 16(7): 597- 613.
80. 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;15(3): 71-277.
81. Vogt A. *Leherbuch und Atlas der Spaltlampenmikroskopie des Lebenden Auge* 1930. 78:30-35.

**FONTES CONSULTADAS**

**BIREME/OPAS/OMS-** Centro Latino- Americano e do Caribe de Informações em Ciências da Saúde ( [http:// bsv01.bireme. br](http://bsv01.bireme.br))

**Associação Brasileira de Normas Técnicas:** Informações e documentação: referências- elaboração NBR 6023. Rio de Janeiro, 2000.

HOUAISS A. **Dicionário Houaiss da língua portuguesa.** 1. ed. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.



**Anexo 1**

**Termo de Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa**

## **Anexo 2**

### **GLOSSÁRIO ENDOTELIAL**

Barreira Endotelial: estrutura anatômica formada pelo conjunto de todos os complexos juncionais existentes no mosaico endotelial com o objetivo de minimizar a hidratação corneal.

Bomba Endotelial: estrutura funcional formada pelo somatório da atividade enzimática existente nas membranas das células endoteliais com objetivo de desidratar a córnea direcionando parte do seu conteúdo aquoso para a câmara anterior.

Coefficiente de variação: descritivo da semiologia do endotélio da córnea responsável pela estimativa da dispersão do tamanho (área) de suas células.

Densidade endotelial: descritivo da semiologia do endotélio da córnea responsável pela estimativa do número de células contidas em cada milímetro quadrado da área do mosaico endotelial.

Descompensação corneal: córnea com edema que apresenta celularidade endotelial inferior ao limiar que consegue mantê-la transparente.

Endotélio da Córnea: tecido epitelial monoestratificado e pavimentoso que reveste a superfície posterior da córnea.

Epitélio Posterior da Córnea: denominação anatômica preconizada, para a estrutura anatômica conhecida como endotélio da córnea, pela Federation Committee on Anatomical Terminology, organização que normatiza a terminologia anatômica humana, reconhecida e traduzida pela Sociedade Brasileira de Anatomia.

Estruturas anexas ao mosaico endotelial: alterações da membrana de Descemet de origem inflamatória ou não, formações celulares da membrana de Descemet ou até mesmo corpos estranhos de origem traumática ou iatrogênicas que possam ser encontrados no mosaico endotelial e que gerem ao exame de microscopia especular imagens distintas das imagens das células endoteliais.

Limiar de descompensação: quantidade mínima de células endoteliais capaz de manter a córnea sem edema e transparente, é estimado segundo a literatura, entre 700 a 400 células/mm<sup>2</sup>.

Mosaico endotelial: conjunto de células endoteliais que revestem toda a superfície posterior da córnea, dispostas uma ao lado da outra em uma única camada.

Percentual de células hexagonais: descritivo da semiologia do endotélio da córnea responsável pela estimativa do percentual de células com seis lados.

Pleomorfismo: variação da morfologia das células endoteliais assumindo formas distintas da hexagonal, ou seja, células com qualquer número de lados que não seja seis: três, quatro, cinco, sete, oito, nove ou mais.

Polimegatismo: variação do tamanho (área) das células endoteliais com preservação do formato hexagonal.

### Anexo 3

#### GLOSSÁRIO ESTATÍSTICO

Amostra: é um subconjunto ou parte de um total, deve ser representativa da população de onde foi extraída, deve ser parecida qualitativamente e quantitativamente com a população de onde foi extraída.

Amostra Standard: é a amostra calculada pelo *Cells Analyzer PAT. REC.* para os aparelhos que não fornecem o CV, utilizando o padrão de variação da área celular endotelial a partir de valores representativos de normalidade endotelial para as várias faixas etárias da vida humana.

Amostra Personalizada: é a amostra calculada pelo *Cells Analyzer PAT. REC.* para os aparelhos que fornecem o CV, utilizando o padrão de variação da área celular endotelial que caracterize a córnea em exame. É a forma mais precisa de se calcular a amostra endotelial.

Desvio-Padrão: é uma medida que descreve a dispersão de uma variável expressa numericamente em torno de sua média, seja para mais ou para menos. Em outras palavras representa a dispersão dos dados ao redor da média.

Erro alfa ou erro tipo I: em um teste estatístico, o erro alfa significa achar uma diferença que na realidade não existe. Relaciona-se com falso positivo.

Erro beta ou erro tipo II: em um teste estatístico, o erro beta significa não achar uma diferença que na realidade existe. Relaciona-se com falso negativo.

Erro relativo planejado: participa do poder estatístico de uma amostra.

Erro relativo calculado: é o erro relativo encontrado toda vez que se conhece o tamanho de uma amostra, pode ser menor que o planejado, neste caso existe validade amostral, pode ser maior que o planejado, neste caso não existe validade estatística.

Especificidade: é a proporção de indivíduos sem a doença que tem um teste negativo para a mesma.

Grau de confiança: é o grau de estabilidade existente em uma medida quando ela é repetida em condições idênticas.

Inferência estatística: é a extrapolação das conclusões obtidas a partir de uma amostra para a população da qual foi retirada.

Intervalo de confiança: é a faixa de valores que uma determinada variável pode assumir, depende de sua média e do erro relativo calculado na amostra de onde foi retirada. Podem ser calculado, na rotina do *Cells Analyzer PAT. REC.*, relativamente a 90%, 95% e 99%. Quando a amostra endotelial for reduzida, o intervalo de confiança da variável estudada será amplo e onde a diminuir quanto maior for a amostra analisada.

Média aritmética: ou simplesmente média, é definida como a soma dos valores observados em uma amostra, dividida pelo número de observações.

Poder estatístico de uma amostra: é determinado considerando-se o grau de confiança planejado para a amostra (freqüentemente utiliza-se 90%, 95% ou 99%), o erro relativo planejado (freqüentemente utiliza-se 0,1 ou 10%, 0,05 ou 5% e 0,01 ou 1%) e o erro relativo calculado.

População: é o conjunto que contém todos os indivíduos com uma característica comum que os delimite.

Sensibilidade: é a proporção de indivíduos com doença que tem um teste positivo para a mesma.