

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia

Daniel Amorim Leite

**ANÁLISE DA RUGOSIDADE DE ENXERTOS CORNEANOS PREPARADOS
PARA TRANSPLANTE ENDOTELIAL EM HUMANOS UTILIZANDO
MICROSCOPIA DE DESFOCALIZAÇÃO, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA E PERFILOMETRIA ÓPTICA**

Belo Horizonte

2014

Daniel Amorim Leite

**ANÁLISE DA RUGOSIDADE DE ENXERTOS CORNEANOS PREPARADOS
PARA TRANSPLANTE ENDOTELIAL EM HUMANOS UTILIZANDO
MICROSCOPIA DE DESFOCALIZAÇÃO, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA E PERFILOMETRIA ÓPTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Vítor de Vasconcelos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Joel Edmur Boteon.

Belo Horizonte

2014

L533a Leite, Daniel Amorim.
Análise da rugosidade de enxertos corneanos preparados para transplante endotelial em humanos utilizando microscopia de desfocalização, microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica [manuscrito]. / Daniel Amorim Leite. - - Belo Horizonte: 2014.
130f.: il.
Orientador: Daniel Vítor de Vasconcelos Santos.
Coorientador: Joel Edmur Boteon.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Transplante de Córnea. 2. Microscopia Eletrônica de Varredura. 3. Epitélio Posterior. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Santos, Daniel Vítor de Vasconcelos. II. Boteon, Joel Edmur. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WW 220

**ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO
DANIEL AMORIM LEITE**

Realizou-se, no dia 19 de dezembro de 2014, às 14:00 horas, 340 da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE ENXERTOS CORNEANOS UTILIZADOS PARA TRANSPLANTE ENDOTELIAL EM HUMANOS*, apresentada por DANIEL AMORIM LEITE, número de registro 2011657207, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Daniel Vitor de Vasconcelos Santos - Orientador (UFMG), Prof(a).Joel Edmur Boteon (UFMG), Prof(a). José Carlos Nogueira (UFMG), Prof(a).Wesley Ribeiro Campos (UFMG), Prof(a). João Marcelo de Almeida Gusmão Lyra (UNCISAL), Prof(a). Adamo Lui Netto (SANTA CASA DE SÃO PAULO).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Lavramos a presente ata que, lida e aprovada, assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2014.

Daniel Vitor de Vasconcelos Santos
Prof. Adjunto (UFMG)

Wesley Ribeiro Campos
Prof. Adjunto (UFMG)

José Carlos Nogueira
Prof. Titular (UFMG)

Joel Edmur Boeton
Prof. Associado (UFMG)

João Marcelo de Almeida Gusmão Lyra
Doutor (UNCISAL)

Adamo Lui Netto
Prof. Assistente (Santa Casa de São Paulo)

Aos meus pais, pela dedicação incondicional
à educação dos filhos.

À Clara e ao Henrique, por me ensinarem a
valorizar os pequenos detalhes da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e por me proporcionarem sempre uma educação de excelência.

À Clara, por compartilhar comigo momentos felizes e apoiar-me durante os desafios e frustrações inerentes à formação médica.

Ao Henrique, pelo sorriso analgésico.

Ao Rubens, Taline e Fernanda, pelo apoio, mesmo que à distância.

A Henriqueta, Aninha e Lourdes, pelos momentos de descontração.

Ao Lobinho, Simone e Luiz Mário, pela energia positiva transmitida do Amazonas.

Aos meus tios e primos, pela confiança.

Ao professor Joel Boteon, por sempre nos permitir alçar nossos sonhos.

Ao professor Daniel Vítor, por sempre estar nos contagiando com sua empolgação pela Oftalmologia e por aceitar os desafios com serenidade.

Ao professor Fernando Trindade, sempre solícito, pelos ensinamentos semanais.

Ao professor Marco Antônio Tanure, pela sua paciência nas discussões semanais de casos.

Aos professores Alfredo Goes, Carolina Reis, Thais Martins e Juliana Lott, por me ajudarem com a execução dos experimentos.

À Professora Luciana Seara, pela paciência nos experimentos com microscopia de força atômica.

Aos Professores Ubirajara Agero, Oscar Nassif e Ulisses Moreira, pela atenção e apoio na microscopia de desfocalização.

Aos Professores Daniel Cunha Elias e Pablo Valentim, pela ajuda nos experimentos com o perfilômetro óptico.

Ao Fábio Medina, por topar qualquer desafio nas cirurgias, sempre solícito a compartilhar sua habilidade.

Ao Frederico Bicalho, pelo exemplo de competência e humildade associadas.

Ao Clóvis, por está disponível para ajudar, sempre com boa vontade.

Ao José Aloísio, por sempre compartilhar sua inteligência.

Ao Eduardo Adan e André Diniz, pelas dicas cirúrgicas no Centro de Oftalmologia Avançada (COA).

Aos meus amigos de residência médica, por me acolherem tão bem em Belo Horizonte.

Aos amigos de Teresina, pelos momentos de descontração nos raros períodos de folga, mesmo que isso tenha que ocorrer em grupos de internet.

À equipe de enfermagem e anestesiologia, do Hospital São Geraldo pela tolerância na manipulação das amostras mesmo durante o período noturno.

À Rose, do Departamento de Oftalmologia, sempre disposta a ajudar.

À Aline, Alcione e toda a equipe do Banco de Olhos da FHEMIG sempre atenciosas para me ajudarem na obtenção das amostras para elaboração da tese.

À equipe do centro de Microscopia (Natália, Roberta e Janine), pela competência na execução das suas atividades.

Aos professores Marcelo Dias Sanches e Ivana Duvalde Araújo, pela dedicação ao programa de pós-graduação.

À Mari e a equipe do Centro de Pós-Graduação, sempre competentes nas suas funções.

Aos familiares dos doadores de córnea, que em um momento de dor demonstraram um ato enorme de solidariedade permitindo que milhares de pessoas sejam beneficiadas.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”
(George Bernard Shaw).

RESUMO

Objetivos: comparar, através da microscopia de desfocalização (MD), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfilometria óptica (PO), a rugosidade das superfícies de córneas preparadas para transplante endotelial por meio das técnicas DMEK (*Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*), DSAEK (*Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*), DSEK (*Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty*) e suas variações. Em seguida, realizar correlação das medidas de rugosidade à MEV, MD e PO para cada técnica de preparo de enxerto corneano.

Metodologia: foram obtidas 31 córneas humanas do banco de olhos da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) descartadas para transplante devido sorologia positiva para hepatite B, C ou HIV, com contagem endotelial superior a 1700 células por milímetro quadrado. Foram excluídas do estudo córneas com tempo de preservação superior a 10 dias, temperatura de conservação na admissão do banco de olhos superior a cinco graus Celsius ou classificadas como tectônicas. As córneas foram divididas em cinco grupos: DSEK 1, DSEK 2, DSAEK 1, DSAEK 2 e DMEK. Após o preparo das córneas através das diferentes técnicas, foi realizada, primeiramente, a análise da superfície através da MD, sendo as amostras mantidas no próprio meio de conservação. Obtiveram-se os índices de rugosidade média 1 (MD1) e 2 (MD2) para cada amostra. Em seguida foi realizado preparo para estudo à MEV, sendo as imagens obtidas nas ampliações de 20X, 350X e 1000X. Para análise qualitativa as imagens com ampliação de 350X foram classificadas em três grupos: grupo 1 (superfície rugosa), grupo 2 (superfície intermediária) e grupo 3 (superfície lisa). Para estudo quantitativo foi utilizada a imagem com magnificação de 350X, analisada pelo *software* image J. As mesmas amostras utilizadas para MEV foram analisadas à PO, obtendo-se os índices de rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq). **Resultados:** não foram encontradas diferenças quanto a rugosidade da superfície do enxerto entre as técnicas de preparo para transplante endotelial através da MD ($p=0,190$ e $0,089$, para MD1 e MD2). Na análise subjetiva da rugosidade à MEV, houve boa correlação entre os observadores (Kappa variando entre 0,6 e 0,8), com diferença estatisticamente significativa apenas entre a técnica DMEK e as demais ($p<0,001$ -extensão do teste exato de Fisher). Na análise quantitativa através dos níveis de cinza (MEV), a superfície dos enxertos preparados para DMEK foi considerada mais lisa em relação às demais ($p<0,001$ -Tukey), excetuando-se a técnica DSAEK 2 ($p=0,062$ -Tukey). Na PO a única diferença significativa foi entre a técnica DMEK e as demais ($p<0,001$ -Tukey). Por fim, houve correlação entre a técnica de PO (através do índice Rq) e os índices de rugosidade obtidos pela microscopia de desfocalização (coeficiente de Spearman(s) – 0,511 e 0,620 para MD1 e MD2, respectivamente). Correlação também foi obtida na comparação com o nível de cinza da MEV ($s=0,501$). **Conclusão:** a técnica DMEK se associou a enxertos corneanos mais lisos que as demais técnicas para transplante endotelial à avaliação pela MEV e pela PO. Foi identificada correlação entre os índices quantitativos de rugosidade na MD, MEV e PO. Estas técnicas de microscopia podem ser úteis para análise da rugosidade dos enxertos corneanos preparados para transplante endotelial.

Palavras-chave: Transplante de córnea; Microscopia Eletrônica de Varredura; Microscopia de Desfocalização; Perfilometria óptica.

ABSTRACT

Objectives: to compare by defocusing microscopy (DM), scanning electron microscopy (SEM) and optical profilometry (OP) the surfaces of grafts that were prepared through DMEK (Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty), DSAEK (Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) and DSEK (Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty) techniques. In addition, to correlate roughness indices of SEM, MD and OP. **Methods:** 31 human corneas from FHEMIG (Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais) eye bank that were discarded for transplantation due to positive serology for hepatitis B, C or HIV, with endothelial cell count of more than 1700 cells per square millimeter were obtained. The corneas with more than 10 days of storage, temperature on admission of more than 5 degrees Celsius, or classified as tectonic were excluded. The corneas were divided into five groups according to graft preparation: DSEK 1, DSEK 2, DSAEK 1, DSAEK 2 and DMEK. After preparation, the graft surface was analyzed by DM and the samples were kept on the Optisol. Mean roughness indices (MD1 and MD2) were then obtained for each sample. The samples were then prepared for SEM and images were acquired at magnification of 20X, 350X and 1000X. For qualitative analysis, the 350X were classified into three groups: group 1 (rough surface), group 2 (intermediate surface) and group 3 (smooth surface). For quantitative analysis, 350X images were analyzed using Image J software. The same samples used for SEM were analyzed by OP with calculation of average roughness index (Ra) and root mean square roughness (Rq). **Results:** No differences in roughness on DM were found between techniques for endothelial corneal transplantation ($p=0,190$ and $0,089$ for MD 1 e MD 2). On the subjective analysis of SEM, good correlation was found between observers (kappa ranging between 0.6 and 0.8). Comparison between groups showed difference only between DMEK technique and the others ($p < 0.001$ -extension of Fisher's exact test). SEM quantitative analysis showed that surface of DMEK grafts were also smoother than others ($p < 0,01$ – Tukey), except DSAEK 2 ($p = 0,062$ Tukey). DMEK grafts were also smoother than others on OP ($p < 0.001$, Tukey). Finally, correlation between the roughness indices on OP (Rq) and on DM was also identified (Spearman coefficient (s) – 0,511 and 0,620). Correlation was also identified with roughness quantification on SEM (s- 0,501). **Conclusion:** DMEK technique provided smoother grafts on SEM and OP. Correlation was identified between roughness quantitative indices on DM, SEM and OP. These techniques may be useful for assessment of roughness of corneal grafts for endothelial transplantation.

Keywords: Corneal Keratoplasty. Scanning Electron Microscopy. Defocusing Microscopy. Optical Profilometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da linha média de uma superfície	20
Figura 2: Desenho esquemático das camadas da córnea	23
Figura 3: Organização histológica da córnea conforme a profundidade analisada	24
Figura 4: Desenho esquemático do remodelamento corneano após as diversas técnicas de transplante	27
Figura 5: Representação esquemática do microscópio eletrônico de varredura .	35
Figura 6: Representação do funcionamento da técnica de microscopia de desfocalização	37
Figura 7: Representação do funcionamento da técnica de perfilometria óptica	38
Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura realizada em amostra preparada através da técnica DSAEK 2	61
Figura 9: Perfilometria óptica realizada em amostra da técnica DSAEK 2	65
Figura 10: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em seis amostras preparadas através da técnica DMEK	91
Figura 11: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em três amostras preparadas através da técnica DSAEK 1	92
Figura 12: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSAEK 2	93
Figura 13: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em sete amostras preparadas através da técnica DSEK 1	94
Figura 14: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em sete amostras preparadas através da técnica DSEK 1	95
Figura 15: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSEK 2	96
Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura realizada em seis amostras preparadas através da técnica DMEK	97
Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura realizada em cinco amostras preparadas através da técnica DSAEK 1	98
Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSAEK 2	99

Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura através do aparelho Quanta com aumento de 350X realizada em oito amostras preparadas através da técnica DSEK 1	100
Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura realizada em oito amostras preparadas através da técnica DSEK 1	101
Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSEK 2	102
Figura 22: Perfilometria óptica realizada em seis amostras preparadas através da técnica DMEK	103
Figura 23: Perfilometria óptica realizada em cinco amostras preparadas através da técnica DSAEK 1	104
Figura 24: Perfilometria óptica realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSAEK 2	105
Figura 25: Perfilometria óptica realizada em oito amostras preparadas através da técnica DSEK 1	106
Figura 26: Perfilometria óptica realizada em oito amostras preparadas através da técnica DSEK 1	107
Figura 27: Perfilometria óptica realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSEK 2	108

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade 1 obtido na técnica microscopia de desfocalização	47
Gráfico 2: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade 2 obtido na técnica de microscopia de desfocalização	47
Gráfico 3: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade obtido por meio de nível de cinza através da técnica de microscopia eletrônica de varredura	51
Gráfico 4: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade R_a (μm) obtido na perfilometria óptica	53
Gráfico 5: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade R_q (μm) obtido na perfilometria óptica	53
Gráfico 6: Diagrama de dispersão bidimensional entre os índices de rugosidades R_q (μm) e índice de rugosidade 1 da microscopia de desfocalização .	54
Gráfico 7: Diagrama de dispersão bidimensional entre o índice de rugosidade R_q (μm) e índice de rugosidade 2 da microscopia de desfocalização	55
Gráfico 8: Diagrama de dispersão bidimensional entre os índices de rugosidades R_q (μm) e os índices objetivos da microscopia eletrônica de varredura	56
Gráfico 9: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade R_q (μm) segundo índice qualitativo de rugosidade da microscopia eletrônica de varredura	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos índices obtidos à microscopia de desfocalização, microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica	46
Tabela 2: Correlação entre observadores para o índice qualitativo de rugosidade através da microscopia eletrônica de varredura	49
Tabela 3: Distribuição do índice qualitativo de rugosidade através da microscopia eletrônica de varredura segundo a técnica de preparo	50
Tabela 4: Comparação entre as técnicas com estroma residual através do índice qualitativo de rugosidade da microscopia eletrônica de varredura	50
Tabela 5: Comparação entre as técnicas com estroma residual (outras) e DMEK através do índice qualitativo de rugosidade da microscopia eletrônica de varredura	51
Tabela 6: Resultados das comparações dos índices de rugosidade entre as técnicas segundo método de comparação múltipla de Tukey	52
Tabela 7: Relação entre o índice de rugosidade Rq (μm) e o índice qualitativo de rugosidade da microscopia eletrônica de varredura	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µm	Micrômetros
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BSS	Solução Salina Balanceada
CHED	<i>Congenital Hereditary Endothelial Distrofy</i>
COEP	Comitê de Ética e Pesquisa
DALK	<i>Deep Anterior Lamellar Keratoplasty</i>
DLEK	<i>Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty</i>
DMEK	<i>Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty</i>
DMET	<i>Descemet Membrane Endotelial Transfer</i>
DSAEK	<i>Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty</i>
DSAEK 1	<i>Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty</i> realizado com microcerátomo Masyk
DSAEK 2	<i>Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty</i> realizado com microcerátomo Moria
DSEK	<i>Descemet Striping Endothelial Keratoplasty</i>
DSEK 1	<i>Descemet Striping Endothelial Keratoplasty</i> realizado na profundidade de 70% da paquimetria central
DSEK 2	<i>Descemet Striping Endothelial Keratoplasty</i> realizado na profundidade de 90% da paquimetria central
ESEM	<i>Environmental Scanning Electron Microscopy</i>
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
HFW	Horizontal Field Width
HV	High Voltage
ICEX	Instituto de Ciências Exatas
LASIK	<i>Laser in Situ Keratomileusis</i>
MD	Microscopia de Desfocalização
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscópio de Força Atômica
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de Mercúrio
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i>

PFS	<i>Perfect Focus System</i>
PLEK	<i>Posterior Lamellar Endothelial Keratoplasty</i>
PO	Perfilometria Óptica
Ra	Rugosidade média
Rmax	Altura Máxima de um Padrão de Rugosidade
Rq	Rugosidade Quadrática Média
SE	Secondary Electron
Scuba	<i>Submerged Cornea Using Backgrounds Away</i>
Tencell	<i>True Endothelial Cell</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Z	Altura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Justificativa	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1	Técnicas de microscopia	35
4	METODOLOGIA	39
4.1	Utilização da microscopia de desfocalização	41
4.2	Utilização da microscopia eletrônica de varredura	42
4.3	Utilização da perfilometria óptica	43
4.4	Ferramentas estatísticas	43
5	RESULTADOS	45
5.1	Análise por meio da microscopia de desfocalização	45
5.2	Análise por meio da microscopia eletrônica de varredura	48
5.3	Análise por meio da perfilometria óptica	52
5.4	Correlação entre as técnicas de análise das superfícies corneanas	54
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A	82
	ANEXO B	83
	ANEXO C	84
	APÊNDICE A	85
	APÊNDICE B	91

1 INTRODUÇÃO

Os recentes avanços nas técnicas de cirurgia de córnea têm levado ao aumento do número de ceratoplastias lamelares em relação às penetrantes. A substituição seletiva apenas da camada comprometida da córnea permite manter a integridade do bulbo ocular, tanto durante como após o procedimento cirúrgico. Doenças afetando as camadas anteriores da córnea podem ser tratadas por técnicas de transplante lamelar anterior profundo, nas quais todo o estroma é removido, mantendo a membrana de Descemet e o endotélio saudáveis. No caso das doenças endoteliais ocorre substituição seletiva apenas desta camada (LIM *et al.*, 2008).

As doenças endoteliais são mais prevalentes na população após a meia idade, com tendência a aumento de incidência devido ao processo de envelhecimento. As principais causas para transplante penetrante incluem ceratopatia bolhosa pseudofácica, ectasia de córnea, doença endotelial corneana, falência endotelial pós-transplante penetrante e úlcera de córnea. As doenças endoteliais são responsáveis, portanto, por três das principais indicações de transplantes (MAU, 2009).

As vantagens dos transplantes endoteliais são: realização do procedimento cirúrgico em sistema fechado, recuperação visual mais rápida, menor indução de astigmatismo, menor incidência de complicações relacionadas à sutura, preservação da estrutura corneana e diminuição da incidência de rejeição devido a menor carga antigênica. Outra possível vantagem é a utilização de uma mesma córnea para dois receptores, como um que será submetido à *Deep Anterior Lamellar Keratoplasty* (DALK) e outro à *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty* (DMEK). (HASHEMI; GHAFARI; MOHEBI, 2012; TONG; MELLES, 2012). Como desvantagem, tem-se uma curva de aprendizado mais longa, investimento financeiro maior do que nos transplantes penetrantes, principalmente tratando-se da técnica *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty* (DSAEK) e alguns resultados visuais insatisfatórios, mesmo com sucesso anatômico do transplante (BANITT; CHOPRA, 2010).

Quando se trata apenas da técnica DMEK, outras vantagens podem ser encontradas além das citadas anteriormente: menor indução de aberrações de alta ordem, custo mais reduzido e substituição apenas da camada corneana de

interesse, sem introduzir outros componentes (como o estroma). Isso torna o procedimento opticamente neutro. As desvantagens deste tipo específico de técnica são o número reduzido de cirurgiões treinados, posicionamento do paciente no pós-operatório, grande necessidade de *reubbling*, necessitando atenção pós-operatória mais intensa (GIEBEL, 2013). A maioria dos pacientes submetidos à DSEK / DSAEK atinge acuidade visual de 0.5, mas apenas de 10% a 25% podem atingir 0.8, ou melhor; ao contrário, 75% dos pacientes submetidos à DMEK atingem acuidade visual de 0.8, ou melhor, dentro dos primeiros seis meses após a cirurgia (TONG; MELLES, 2012).

As contraindicações para transplante endotelial incluem: leucomas centrais, opacidades ou distrofias estromais. Nesses casos, o transplante penetrante está indicado. Outras contraindicações relativas incluem: ambliopia, glaucoma não-controlado, alterações retinianas ou do nervo óptico que possam comprometer o resultado final do transplante (MAU, 2009).

O grande desafio das técnicas de DSEK / DSAEK, entretanto, é entender o porquê de transplantes com sucesso anatômico excelente poderem ter resultado funcional insatisfatório. É difícil estratificar a influência de variáveis confundidoras que podem também estar relacionadas com tal resultado, como, por exemplo, condições oculares prévias ao transplante (doença retiniana, glaucoma, opacidade prévias, etc.) (DIRISAMER *et al.*, 2013). Vários fatores podem afetar a qualidade visual em olhos submetidos à ceratoplastia. Fatores relacionados à superfície ocular e ao segmento anterior incluindo a dinâmica do filme lacrimal, aberrações corneanas de baixa e alta ordem, opacidades anteriores ou posteriores e descentrações pupilares podem ser responsáveis por resultado visual insatisfatório (KOH *et al.*, 2012a).

Dirisamer *et al.* (2013) avaliaram as possíveis causas de baixa acuidade visual em pacientes submetidos a DMEK após acuidade visual insatisfatória com a técnica DSEK. Entre as explicações estão: falência tardia do enxerto, descolamento do mesmo, perpetuando quadro de edema estromal, refletividade aumentada na interface estromal na técnica DSEK / DSAEK, observada tanto biomicroscopicamente como com a microscopia confocal. Enquanto na técnica DMEK observa-se refletividade normal, nas outras técnicas foi observado algum grau de opacificação em 75% dos casos. Outra variável observada é a irregularidade na espessura do enxerto. A presença de ondulações na porção estromal interfere na

qualidade óptica, já que a transparência corneana depende da interferência construtiva da luz e qualquer distorção do paralelismo das camadas estromais pode comprometer a qualidade óptica. Por fim, a presença de Descemet residual no receptor na região do eixo pupilar pode influenciar também na qualidade óptica (DIRISAMER *et al.*, 2013).

Resumidamente, os dois principais fatores envolvidos nas diferenças visuais entre as técnicas DMEK e DSEK / DSAEK são a eliminação da interface estromal na primeira técnica e pelo fato da mesma produzir um enxerto extremamente fino. Entretanto, a premissa de que a arquitetura da interface é o fator determinante na acuidade visual final pode ser confirmada quando enxertos aparentemente sem alterações anatômicas são substituídos por outro (mesmo mais espesso) e a acuidade visual melhora (TERRY *et al.*, 2012).

A espessura do enxerto pode ter influência na acuidade visual nos seus extremos, mas não na faixa comumente obtida (100-200 micrômetros) (TERRY *et al.*, 2012). Não está, portanto, muito claro se tecidos mais finos proporcionam melhor visão. Na realidade a presença de qualquer interface estromal pode interferir com a visão de tal forma que a espessura não seria o ponto principal (TARAVELLA; SHAH; DAVIDSON, 2013). Dissecção de enxertos muito finos pode, portanto, ser desnecessária (SHINTON *et al.*, 2012).

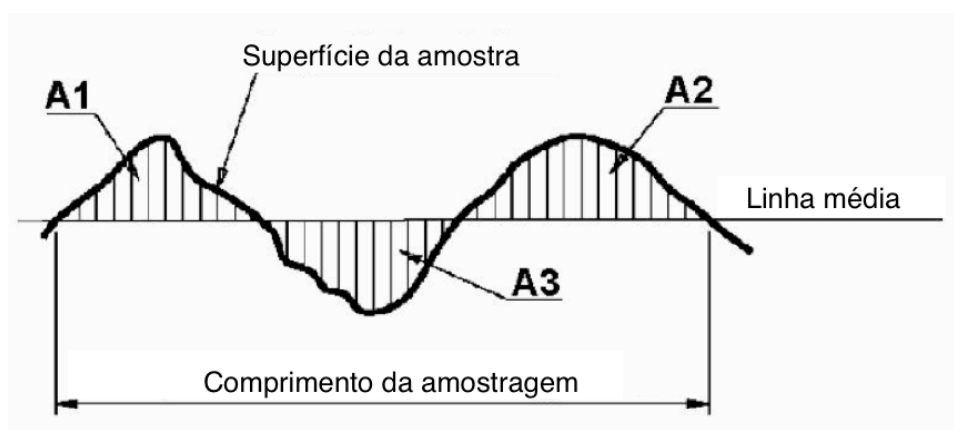
Em pacientes submetidos à DSEK / DSAEK não ocorre compensação entre as aberrações da superfície anterior e posterior da córnea, devido a perda do paralelismo. Nos transplantes penetrantes e lamelares anteriores profundos essa compensação é mantida. Nos endoteliais com estroma residual, além de não ocorrer compensação de aberrações ópticas de alta ordem, essas podem aumentar em 20% devido à superfície posterior do transplante (YAMAGUCHI *et al.*, 2011). Apesar disso, as irregularidades na superfície anterior da córnea seriam as principais responsáveis pela indução de aberração. A diferença nos índices de refração entre a porção anterior da córnea e o ar é maior que a diferença entre a porção posterior da córnea e o humor aquoso, o que mais explica a importância da superfície anterior na geração de aberrações. Os aparelhos atuais têm dificuldade em compartimentalizar a influência de cada porção da córnea nas aberrações geradas (KOH *et al.*, 2012b).

A superfície dos enxertos doadores pode ser outra variável que influi no resultado visual final, sendo o tema desta tese. Enxertos mais lisos teoricamente criam uma melhor interface óptica (SARAYBA *et al.*, 2007a; MARIAN *et al.*, 2013).

Baseado nisso, supõe-se que a superfície corneana dissecada com microcerátomo seria mais lisa do que a dissecada com espátulas, teoricamente proporcionando uma melhor acuidade visual final (LOMBARDO *et al.*, 2012). Isso não foi comprovado por Price e Price (2006), que obtiveram acuidade visual aos seis meses semelhante entre as técnicas DSEK e DSAEK. Na técnica DSAEK a recuperação visual foi mais rápida apenas no primeiro mês, também com menor índice de perfuração dos enxertos durante o preparo. A remodelação do estroma nos meses seguintes na técnica DSEK pode explicar a obtenção de acuidade visual semelhante aos seis meses (PRICE; PRICE JR., 2006). A média de acuidade visual após DSAEK é de 0,5, enquanto que no DSEK não é incomum obter-se 0,8, ou melhor, através de enxertos obtidos com a técnica e instrumentais corretos (HAM *et al.*, 2010; VAN DER MEULEN *et al.*, 2012). O custo de um microcerátomo, com a câmara artificial e as cabeças para dissecção no DSAEK, é superior a cem mil reais; já as espátulas para dissecção na técnica DSEK custam em torno de cinco mil reais.

Para análise de uma superfície deve-se avaliar a ondulação da mesma, erro de forma e a rugosidade. Esta é o conjunto de irregularidades, isto é, pequenas saliências e reentrâncias presentes em uma superfície e desempenham um importante papel no comportamento dos micro sistemas. A medida de rugosidade no Brasil é normalizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e baseia-se no sistema M ou sistema de linha média. Esta é a linha paralela: a forma do perfil, de tal sorte que a soma das áreas superiores, compreendidas entre ela e o perfil efetivo seja igual à soma das áreas inferiores (Figura 1) (COSTA, 2008).

Figura 1: Representação esquemática da linha média de uma superfície.



Legenda: A1, A2 e A3 – áreas em referência à linha média.
Fonte: Costa (2008).

Com base no sistema de linha média surgem as definições de rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq). A primeira é calculada como média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento dos pontos do perfil de rugosidade em relação a linha média dentro do percurso de medição. Já o Rq é obtido pela média quadrática. Outros parâmetros podem ser também analisados como: simetria na distribuição das alturas (*Skewness*) ou comparação entre picos de uma amostra (*Kurtosis*) (COSTA, 2008).

1.1 Justificativa

O número de transplantes endoteliais tem apresentado aumento expressivo na última década mundialmente. Apesar dos avanços, diversos aspectos do entendimento dessa modalidade de transplante são obscuros. Diferenças nas interfaces geradas podem explicar o porquê de resultados visuais distintos entre as técnicas. Essa interface sofre influência da superfície do enxerto doador, que varia de acordo com a técnica utilizada. A microscopia eletrônica de varredura é comumente utilizada para avaliação dessas superfícies, porém sua análise é essencialmente qualitativa, requerendo o preparo da amostra para tal, o que pode gerar distorções da mesma. A microscopia de desfocalização é uma técnica em desenvolvimento que pode ser capaz de reconstruir a superfície desses enxertos, fornecendo também análise quantitativa da mesma. A perfilometria óptica também tem como vantagem a obtenção de índices de rugosidade, facilitando a comparação entre as amostras.

Assim sendo, este estudo avalia a superfície dos enxertos utilizados para transplante endotelial através de três ferramentas, buscando índices quantitativos de rugosidade que possam facilitar a comparação das amostras e justificar diferenças obtidas na prática clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a superfície dos enxertos de córneas humanas, preparados através das técnicas DMEK, DSAEK, DSEK e suas variações, por meio da microscopia de desfocalização, microscopia eletrônica de varredura e Perfilometria Óptica (PO).

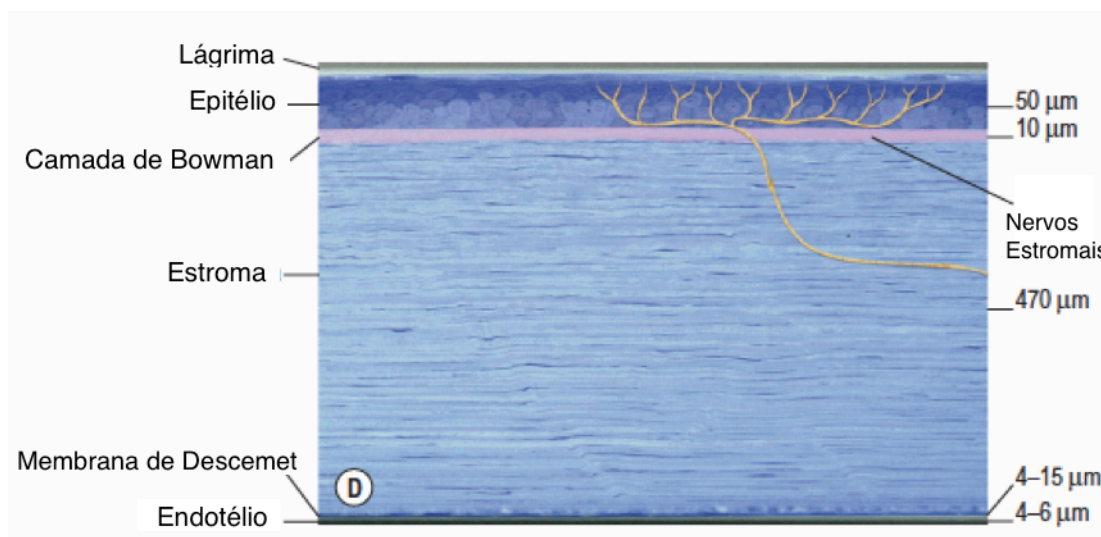
2.2 Objetivos específicos

- Analisar qualitativamente a rugosidade das superfícies dos enxertos corneanos preparados através das técnicas DMEK, DSAEK, DSEK e suas variações utilizando a MEV;
- Analisar, por intermédio de índices quantitativos de rugosidade, a superfície dos enxertos corneanos preparados por meio das técnicas DMEK, DSAEK, DSEK e suas variações utilizando a MD, MEV e a PO;
- Comparar e avaliar a concordância entre índices de rugosidade obtidos à MEV, PO e MD para cada técnica de preparo de enxertos corneanos para transplante endotelial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A córnea é composta por cinco camadas: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura 2) (KAUFMAN *et al.*, 2011). Em 2013, foi proposta por Dua *et al.* (2013) a presença de uma camada pré-Descemet, que recebeu o seu nome. Tal observação foi decorrente de estudo em córneas submetidas a transplante lamelar anterior através da técnica de *big-bubble* (DUA *et al.*, 2013).

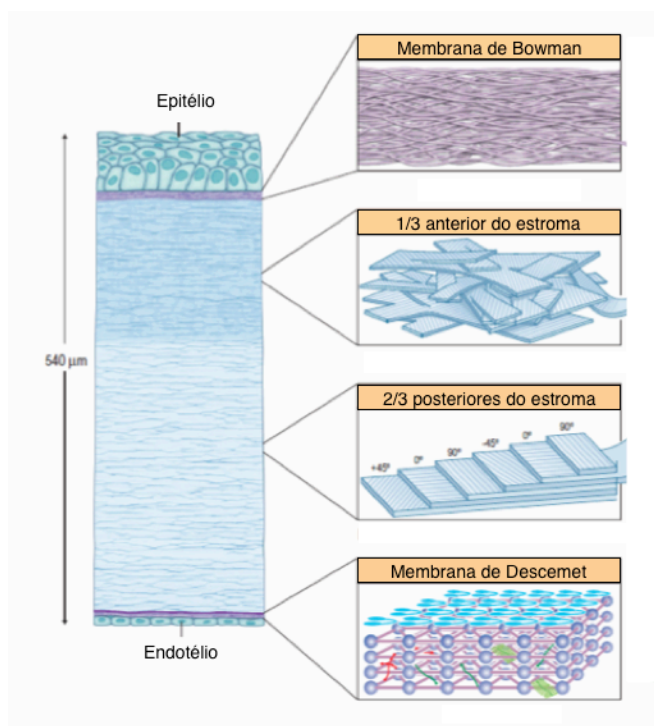
Figura 2: Desenho esquemático das camadas da córnea.



Legenda: μm – Micrômetros.
Fonte: Kaufman *et al.* (2011).

O estroma corneano possui orientação das lamelas de colágeno diferente conforme a profundidade analisada. No terço anterior há uma maior desorganização dessas lamelas, o que aumenta a resistência para forças agindo no sentido ântero-posterior. (Figura 3). Isso pode explicar a maior fragilidade biomecânica de córneas submetidas a *Laser in Situ Keratomileusis* (LASIK), pois a criação do *flap* modifica a estrutura da córnea mais que as ablações de superfície. Já nos dois terços posteriores há uma maior organização das lamelas, o que as deixa naturalmente mais frouxas, com menor resistência a forças ântero-posteriores (KAUFMAN *et al.*, 2011).

Figura 3: Organização histológica da córnea conforme a profundidade analisada.



Legenda: (a) desorganização das lamelas de colágeno no terço anterior do estroma corneano; (b) padrão organizacional das lamelas de colágeno nos dois terços posteriores do estroma corneano.
Fonte: Adaptado de Kaufman *et al.* (2011).

O endotélio funciona como uma bomba permitindo a deturgescência e a consequente transparência da córnea. A perda endotelial pode ocorrer devido à idade avançada, doenças hereditárias ou trauma cirúrgico, resultando em disfunção endotelial com subsequente edema da córnea (STRAIKO; SHAMIE; TERRY, 2010). O endotélio humano não tem a capacidade de replicar-se *in vivo*, possuindo o adulto jovem uma contagem de 3500 células por milímetro quadrado e uma espessura corneana central média de 550 micrômetros (MAU, 2009).

As duas principais indicações de transplante endotelial são a distrofia endotelial de Fuchs e a ceratopatia bolhosa pseudofácica. A primeira é uma condição bilateral lentamente progressiva que afeta a camada endotelial, tornando-se clinicamente evidente na quarta e quinta década de vida, mas frequentemente não sintomática até a sexta década. É uma doença autossômica dominante, com penetrância incompleta, afetando as mulheres três vezes mais do que os homens. Nos estágios iniciais os pacientes apresentam visão borrada e de halos principalmente no início da manhã, quando a desidratação do estroma diminui

devido à pálpebra permanecer fechada durante o sono. Com a evolução da doença, o edema persiste durante todo o dia e as bolhas epiteliais microcísticas podem confluir e romperem-se, deixando o quadro doloroso. Esses episódios tornam-se frequentes, podendo levar a erosões recorrentes, ceratites infecciosas e cicatrizes corneanas. Nessas situações, o transplante de córnea tem sua indicação (MAU, 2009). A distrofia endotelial de Fuchs foi a principal causa de transplante penetrante nos EUA em 2011(20,8%), sendo também a indicação mais comum para transplante endotelial (48%) (TALAJIC; STRAIKO; TERRY, 2013).

A ceratopatia bolhosa pseudofácica constitui outra indicação para a realização de transplante endotelial. Em 2000, nos EUA, 22,3% dos transplantes foram realizados por esse motivo. Entretanto, com a melhoria das técnicas de facoemulsificação esse número reduziu (GROTTONE; PEREIRA; GOMES, 2012). Constitui ainda a segunda causa de indicação de transplantes endoteliais nos EUA, sendo responsável por 19,2% (TALAJIC; STRAIKO; TERRY, 2013).

A facectomia leva a uma perda de 2,5% das células endoteliais por ano, sendo que a maioria das córneas tolera tal perda. O desencadeamento de um quadro de ceratopatia bolhosa associa-se com a presença muitas vezes subclínica da distrofia endotelial de Fuchs. O quadro pode iniciar-se tanto no pós-operatório imediato quanto tardiamente. Outros fatores de risco para o desenvolvimento do quadro são: alto poder de ultrassom utilizado para catarata madura, síndrome de pseudoexfoliação e a presença de lente de câmara anterior (MAU, 2009).

Outras causas de transplante endotelial são responsáveis por 12,3% dos casos nos EUA, correspondendo à falência pós-transplantes penetrantes, síndrome endotelial iridocorneana e distrofia endotelial hereditária congênita. O retransplante endotelial ocorre em 8,5%. Menos comumente pode ser indicado para controle apenas da dor ou da aparência cosmética em ceratopatia bolhosa dolorosa sem prognóstico visual (TALAJIC; STRAIKO; TERRY, 2013).

A ideia de realizar a substituição seletiva das camadas da córnea doente é creditada a Von Hippel, em 1886. O primeiro transplante de córnea em que se obteve sucesso foi realizado por Zirm somente em 1905 (BANITT; CHOPRA, 2010). Durante várias décadas os transplantes lamelares foram abandonados em favor dos transplantes penetrantes. Em 1956, Tillett realizou um transplante com característica de lamelar posterior, fazendo uma dissecação lamelar profunda da córnea receptora e utilizando suturas para fixar o enxerto doador, o que tornava o procedimento de





elevada complexidade e com elevada taxa de complicações como glaucoma de fechamento angular devido sinéquias e falência endotelial (ANSHU *et al.*, 2013).

Em 1998, Melles propôs, então, a utilização de bolha de ar ao invés de suturas para fixação do enxerto, iniciando a era da moderna cirurgia endotelial nomeando-a ceratoplastia lamelar posterior. Porém, a dissecação da córnea doadora e receptora ainda era um desafio (STRAIKO; SHAMIE; TERRY, 2010; TALAJIC; STRAIKO; TERRY, 2013). Terry fez modificações na técnica com a introdução de novos instrumentos, utilização de câmara artificial e viscoelástico coesivo, renomeando como ceratoplastia lamelar profunda (TALAJIC; STRAIKO; TERRY, 2013).

Apesar disso, as técnicas não se tornaram populares devido à complexidade e a limitada acuidade visual obtida decorrente da interface gerada por duas superfícies dissecadas manualmente (PRICE; PRICE JR., 2010). Em 2004, Melles divulgou a técnica do *stripping* (retirada) da membrana de Descemet, o que evitava a manobra de dissecação estromal profunda, gerando uma superfície mais lisa para manter contato com a córnea doadora, nomeando-a *Descemet Striping Endothelial Keratoplasty* (DSEK).

Gorovoy, em 2006, propôs a utilização do microcerátomo, facilitando o preparo do enxerto doador, denominando-a *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty* (DSAEK) (STRAIKO; SHAMIE; TERRY, 2010). Em 2006, Melles apresentou a técnica *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty* (DMEK) experimentalmente, em que apenas endotélio e Descemet eram transplantados, com uma superfície teoricamente mais lisa do que com a presença de estroma residual como nas técnicas DSEK e DSAEK (PRICE; PRICE JR., 2010). Tappin mostrou que tal técnica poderia ser realizada na prática clínica, usando uma cânula para implante do enxerto conhecido como Tencell (*True Endothelial Cell*) (Figura 4) (GIEBEL, 2006).

Figura 4: Desenho esquemático do remodelamento corneano após as diversas técnicas de transplante.

Tipo de transplante	Alteração estromal	Representação
Transplante penetrante	Substituição completa	
PLEK/DLEK	Remove e adiciona estroma	
DSEK/DSAEK	Adiciona estroma	
DMEK	Não adiciona estroma	

Legenda: PLEK – *Posterior Lamellar Endothelial Keratoplasty*; DLEK – *Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty*; DSEK – *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty*; DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*; DMEK – *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*.
Fonte: Giebel (2006).

O número de transplantes endoteliais vem aumentando a cada ano com a transição do transplante penetrante para os lamelares. Em 2005, apenas 1429 transplantes endoteliais foram realizados, aumentando para 18221 em 2009, representando 30,5% dos transplantes realizados nos Estados Unidos (EUA). Apenas entre 2007 e 2008 esse número triplicou (STRAIKO; SHAMIE; TERRY, 2010). Os transplantes penetrantes diminuíram de 45821 em 2005 para 23269 em 2009 (GROTTONE; PEREIRA; GOMES, 2012). Em 2011, o número de transplantes endoteliais superou o de penetrantes nos EUA (TALAJIC; STRAIKO; TERRY, 2013). Aproximadamente 25.000 cirurgias são realizadas por ano devido doenças endoteliais, correspondendo a 57% das indicações de transplante (STRAIKO; SHAMIE; TERRY, 2010). Foram realizados 14696 transplantes penetrantes de córnea no Brasil em 2011 (ALMEIDA; SOUZA, 2014). Não há dados a respeito do número de transplantes lamelares realizados.

Existem na atualidade três técnicas principais para realização de transplante endotelial: DSEK, DSAEK e DMEK. As duas primeiras técnicas diferem quanto ao

modo de preparo, porém as técnicas de inserção, posicionamento e fixação são semelhantes. A terceira técnica possui características próprias de preparo, inserção, posicionamento e fixação. A técnica DSEK encontra-se em desuso devido à dificuldade de execução da mesma, porém tem um custo operacional mais baixo do que o DSAEK devido ao uso de espátulas ao invés do microcerátomo (ROSE; KELLIHER; JUN, 2009; DAPENA; HAM; MELLES, 2009). A córnea doadora é montada em câmara artificial, necessitando assim de rima escleral de pelo menos dois milímetros (mm). Com as espátulas realiza-se a dissecação do estroma profundo da córnea. A dissecação tende a ser a mais profunda possível (SHINTON; TSATSOS; KONSTANTOPOULOS, 2012; PRICE; PRICE JR., 2006); na técnica DSAEK utiliza-se microcerátomo para confecção do enxerto doador, facilitando o procedimento. A córnea pode ser dissecada em duas passadas do microcerátomo, produzindo enxertos mais finos como proposto por Busin (TARAVELLA; SHAH; DAVIDSON, 2013; BUSIN *et al.*, 2013). A utilização de paquímetro ultrassônico antes da confecção do enxerto pode auxiliar na escolha da espessura da cabeça do microcerátomo que será utilizado. Além disso, o uso prévio da Tomografia de Coerência Óptica (*Optical Coherence Tomography* – OCT) também pode auxiliar na escolha da cabeça do microcerátomo.

A técnica do DMEK descrita originalmente por Melles é essencialmente manual, tornando a curva de aprendizado mais longa (YOERUEK *et al.*, 2012). É realizado *stripping* da membrana de Descemet em 360 graus ao nível da linha de Schwalbe (GUERRA *et al.*, 2011). Para localização da mesma pode-se utilizar como referência a pigmentação do trabeculado (FENG; PRICE; PRICE JR., 2013). Tal manobra libera a área de maior adesão do complexo endotélio-Descemet. O importante nesse passo é garantir que não existam áreas do complexo presas a linha de Schwalbe, minimizando os riscos de rasgadura do mesmo. Para facilitar a visualização do enxerto utiliza-se azul de Tripan. Em seguida tal complexo é dissecado em direção ao centro da córnea com auxílio de pinças (GIEBEL, 2013; TOURTAS *et al.*, 2012). Essa dissecação inicial é realizada até em torno de 4 mm do centro da córnea, não necessitando abranger os 360 graus da mesma. Realiza-se trepanação parcial da área central em torno de oito milímetros de diâmetro, variando conforme o caso, evitando-se trepanação total e garantindo separação completa entre a área trepanada centralmente e a periferia. Isso é importante também para evitar rasgadura durante o preparo do enxerto. Conclui-se o *stripping* da Descemet,

mantendo-se a córnea doadora recoberta por Solução Salina Balanceada (BSS), diminuindo a tensão superficial, evitando o rasgo do enxerto (FENG; PRICE; PRICE JR., 2013). Tal técnica de manter recoberto o enxerto doador é conhecida como Scuba (*Submerged Cornea Using Backgrounds Away*) technique (MAIER *et al.*, 2013). Forma-se assim o enxerto doador que devido propriedades elásticas tende a manter-se na forma de um papiro, com a face endotelial enrolando-se para dentro (TOURTAS *et al.*, 2012).

Uma variação da técnica de preparo para DMEK é o uso da dissecação com ar para obter separação entre Descemet e o estroma corneano, realizando-se em seguida o *peeling* da membrana de Descemet e endotélio (YOERUEK *et al.*, 2012). Outra opção é montar a córnea doadora invertida na câmara artificial, realizar trepanação parcial da mesma, seguida por dissecação com ar. Completa-se o *peeling* com pinças (MURAINÉ *et al.*, 2013). O uso do laser de femtosegundo para preparo de enxertos endoteliais vem sendo pesquisado, porém, observa-se que a superfície desses se mantém mais rugosa do que quando preparados com microcerátomo (SOONG *et al.*, 2008; MEHTA *et al.*, 2008). Variáveis como profundidade e energia de ação do laser parecem influir na qualidade dos cortes como demonstrado por Lombardo através do uso do Microscópio de Força Atômica (MFA) (LOMBARDO *et al.*, 2012; PHILLIPS *et al.*, 2013). A realização do acoplamento da plataforma do laser de femtosegundo pela face endotelial ao invés da epitelial é outro fator que pode influir na qualidade dos cortes (HJORTDAL *et al.*, 2012).

Outra técnica para preparo utilizada é um híbrido entre DMEK e DSAEK, chamado DMEK-S. A porção central tem as vantagens do DMEK, com uma rima na periferia de 360 graus como suporte estromal (STUDENY *et al.*, 2013). Essa aba facilita as manobras de desenrolar o enxerto e posicioná-lo na câmara anterior. O preparo por meio desta técnica é trabalhoso, já que é necessária a realização de *big bubble*, à semelhança do lamelar anterior profundo (DALK). Diferente dessa última, a injeção de ar no estroma profundo pode ser realizada tanto via superfície anterior (necessário uso de câmara artificial) ou pela porção endotelial. Com o uso de tesouras de córnea resseca-se a porção estromal central, deixando tal área com a Descemet nua (STUDENY *et al.*, 2010). Periféricamente mantém-se o anel estromal em torno de 2 mm e, por fim, realiza-se a trepanação de espessura total no diâmetro desejado (MCCAULEY; PRICE JR.; PRICE, 2009).

O preparo da córnea receptora é semelhante entre as três técnicas atualmente realizadas. Alguns cirurgiões têm optado por realizar sob anestesia tópica e sedação o preparo do receptor, porém o modo mais amplamente difundido é o bloqueio peribulbar (PRICE; PRICE JR., 2010). A incisão principal pode ser *clear* córnea, limbar ou túnel escleral. O tamanho varia entre três a cinco milímetros, de forma que incisões menores podem relacionar-se com maior perda endotelial. São realizadas incisões acessórias para facilitar a manipulação do enxerto (TARAVELLA; SHAH; DAVIDSON, 2013). Para realização do *stripping* da membrana de Descemet é preferível realizar inicialmente apenas incisão acessória para evitar colabamento da câmara anterior durante o procedimento (mesmo com uso de ar, BSS ou viscoelástico). Variações podem ocorrer quando se realiza procedimento tríplice. A membrana de Descemet é rompida com uso de um Sinsky invertido, realizando um movimento circular semelhante a uma capsulorrexis, na dimensão desejada para realização do transplante. Uma marcação com violeta de genciana pode ser realizada no epitélio para facilitar a manutenção do tamanho da dissecação. Deve-se evitar aprofundar a dissecação para que não englobe o estroma corneano durante o procedimento (TARAVELLA; SHAH; DAVIDSON, 2013). O complexo endotélio-Descemet deve ser retirado em bloco único, evitando-se rasgadura do mesmo. Uma iridectomia inferior é realizada para evitar-se bloqueio pupilar (GUERRA *et al.*, 2011). Para manter a câmara anterior estável durante o procedimento pode-se fazer uso de um mantenedor de câmara, que pode ser acoplado a uma seringa com ar ou mesmo a um vitreófago no modo de troca fluido-gasosa (BIALER; BAHAR, 2011).

As técnicas de inserção diferem entre DSEK / DSAEK e DMEK. Diversas são as formas de inserção nas duas primeiras técnicas, com resultados conflitantes sobre qual seria a técnica com melhor reprodutibilidade e ao mesmo tempo com baixa perda endotelial (DAPENA; HAM; MELLES, 2009). O uso de pinça de Charlie dobrando o enxerto doador como um taco de forma assimétrica com 60% da face estromal iniciando o toque na face receptora tem mostrado bons resultados. A perda endotelial com essa técnica após seis meses varia entre 31-54% (ANSHU *et al.*, 2012; TARAVELLA; SHAH; DAVIDSON, 2013). Outra opção é o uso de injetores como proposto por Tan. Foi demonstrada uma perda endotelial de 13% e 15,6% em seis meses e um ano respectivamente. Uma terceira alternativa é o uso do "glide" desenvolvido por Busin, juntamente com pinças para manipulação do mesmo (ANSHU *et al.*, 2012). Demonstrou-se perda endotelial de 23,5% aos 12 meses e de

26,4% entre 18-24 meses (BAHAR *et al.*, 2009). Outra opção é a inserção do enxerto preso a um fio para orientação do mesmo durante a inserção (PRICE; PRICE JR., 2010; TALAJIC; STRAIKO; TERRY, 2013). O tamanho da incisão parece ser uma variável importante na perda endotelial, pois durante a inserção e passagem pela mesma existe compressão do enxerto resultando em dano do endotélio (GANGWANI; OBI; HOLLICK, 2012). Após a inserção, o enxerto deve ser posicionado corretamente. Isso é realizado através de pequenos jatos de BSS na câmara anterior e introdução de bolha de ar para realizar abertura do mesmo. Devido ao suporte estromal, esta manobra de abertura é menos complexa nas técnicas DSEK / DSAEK do que na técnica DMEK (TOURTAS *et al.*, 2012). A câmara anterior é preenchida totalmente com ar para ocorrer completa aposição entre o enxerto doador e o receptor (GUERRA *et al.*, 2011).

Com relação ao DMEK, a etapa de inserção e posicionamento do enxerto torna a técnica com longa curva de aprendizado (YOERUEK *et al.*, 2013). Vários injetores estão sendo desenvolvidos na tentativa de facilitar o procedimento. Dapena propôs o uso de pipetas para facilitar tal inserção (FENG; PRICE; PRICE JR., 2013). A idade do doador sendo acima de quarenta anos facilita as manobras de desdobramento do enxerto na câmara anterior, já que é um tecido mais espesso e com maior resistência a tendência natural do endotélio de enrolar-se (GIEBEL, 2013). Melles descreve uma série de manobras para facilitar a identificação da orientação correta do enxerto na câmara anterior e promover a abertura do mesmo (Técnica *no touch*, técnica de Dirisamer, manobra de Dapena, etc.) (LIARAKOS *et al.*, 2013). A evolução da técnica tem proporcionado o aumento do número de cirurgias (DAPENA; HAM; MELLES, 2009). Existem relatos da convocação de pacientes submetidos à DSAEK para substituição do mesmo por DMEK (HAM *et al.*, 2010). O principal desafio dessa técnica é desenrolar e posicionar o enxerto, com mínimo dano endotelial. Terry questiona o porquê da não realização de DMEK e apresenta algumas suposições para isso: procedimento é muito difícil e com longa curva de aprendizado; preparo manual leva à perda de tecidos, com elevação de custo e cancelamento de cirurgias; e vários pacientes submetidos à DSAEK estão satisfeitos com os resultados obtidos (TERRY, 2012).

As técnicas de transplante endotelial têm proporcionado a utilização de córneas inviáveis para penetrante, como aquelas com leucoma anteriores, córneas submetidas à cirurgia refrativa, córnea de crianças e recém nascidos, etc. (MAU,

2009). Armour *et al.* (2007) encontraram taxas semelhantes de densidade endotelial entre córneas com ou sem alterações da porção anterior. Na atualidade, vem ocorrendo um aumento pela demanda de tecidos para transplante. Esse aumento vem acompanhado por um número crescente de potenciais doadores de córnea que estão sendo submetidos a cirurgia refrativa na atualidade. Com o transplante endotelial as córneas desses pacientes podem ainda sim ser captadas para transplante (ARMOUR *et al.*, 2007). Uma preocupação com a utilização dessas córneas é que as alterações observadas na porção anterior possam ter transmitidas durante a dissecação para o enxerto receptor, bem como alterações topográficas de pacientes submetidos à cirurgia refrativa. Mesmo que tais situações ocorram, pouca influência sobre a acuidade visual parece ocorrer (PHILLIPS *et al.*, 2009; MOSHIRFAR *et al.*, 2012).

Casos extremos também vêm sendo beneficiados com estas técnicas: olhos vitrectomizados, com aniridia ou submetidos a várias cirurgias fistulantes. Nessas situações, existe um maior risco de descolamento do enxerto e uma maior perda endotelial (KHOR *et al.*, 2013). Uma técnica para auxiliar em tais situações é o uso de suturas de prolene para fixação do enxerto doador (PRICE; PRICE JR.; TRESPALACIOS, 2007; EGUCHI *et al.*, 2012). Existem relatos de sucesso também em olhos com anomalias do desenvolvimento do segmento anterior como: *Congenital Hereditary Endothelial Distrofy* (CHED), microcórnea, olhos buftálmicos, síndrome de Peters, etc. Devido aos bons resultados, a indicação cirúrgica tem sido realizada cada vez mais cedo para evitar-se ambliopia e opacificação da córnea (BUSIN; BELTZ; SCORCIA, 2011; ANWAR; DANASOURY; HASHEM, 2012). Nos casos de síndrome de Peters, tem-se uma maior dificuldade devido à sinéquias irido-corneanas, dificultando o *stripping* da Descemet e a adesão do enxerto doador (HASHEMI; GHAFARI; MOHEBI, 2012). Além disso, pacientes submetidos a transplante penetrante e que se apresentam com falência endotelial podem também ser submetidos a transplante endotelial. Falência endotelial tem sido atualmente umas das principais indicações para retransplante penetrante, perfazendo um total de 18-40% das indicações. As taxas de descolamento do enxerto e de perda endotelial são mais altas do que em olhos não submetidos a transplante prévio (COVERT; KOENIG, 2007). Nesses casos, o *stripping* da membrana de Descemet do receptor pode não ser realizado, já que pode ocorrer deiscência do enxerto durante as manobras (STRAIKO; TERRY; SHAMIE, 2011). Há relato também do uso

de enxertos endoteliais em casos de iminência de perfurações corneanas, promovendo suporte tectônico até completa recuperação da área de fragilidade (descemetocèle) (GRAUE-HERNANDEZ *et al.*, 2012).

Dirisamer *et al.* (2012a) descreveram alguns casos em que houve descolamento do enxerto endotelial, porém a córnea recuperou a transparência. Tal descolamento ocorreu dentro de poucas horas após o transplante, o que suscita o questionamento se o pouco tempo de aposição entre as estruturas seria suficiente para promover repovoamento endotelial ou se esse ocorreria por um possível estímulo para multiplicação de células endoteliais. Esses casos foram englobados com o nome DMET (*Descemet Membrane Endotelial Transfer*). Três situações podem ser elencadas na situação em que houve o clareamento da córnea sem a apropriada aposição do enxerto. A primeira é de que a *descemetorrexis* tenha sido incompleta e que essa porção residual tenha sido capaz de promover clareamento da córnea. O segundo e terceiro cenários podem relacionar-se com a migração de células do enxerto doador para o estroma receptor e com um possível estímulo de células-tronco endoteliais (DIRISAMER *et al.*, 2012a). Outro ponto a considerar é a divisão em dois grupos: com disfunção das células endoteliais, cujo representante principal é a distrofia endotelial de Fuchs e com lesão permanente, cujo principal representante é a ceratopatia bolhosa pseudofácica. No primeiro grupo esta disfunção endotelial pode ser compensada com a retirada do tecido doente, o que estimularia a recuperação do endotélio residual. Existem relatos de que somente a *descemetorrexis*, sem a inserção do endotélio doador, seria estímulo suficiente para recuperação endotelial. Já no grupo da lesão endotelial permanente para que ocorra recuperação corneana é necessário o transplante de endotélio (DIRISAMER *et al.*, 2012b). A principal desvantagem dessa técnica é a imprevisibilidade da recuperação endotelial e baixa contagem endotelial obtida (DIRISAMER *et al.*, 2012a).

A cirurgia de catarata também se modificou com o advento dos transplantes endoteliais. A realização de facectomia associada a transplante foi denominada novo procedimento triplo (LAASER *et al.*, 2012). No caso da realização de DSEK / DSAEK faz-se cálculo biométrico para deixar paciente míope 1,5 dioptria, já que o transplante gera um desvio hipermetrópico deste valor. A técnica de DMEK, por sua vez, é considerada um transplante opticamente neutro (BONFADINI *et al.*, 2013).

Complicações como bloqueio pupilar (evitado com a realização de iridectomia), descolamento ou descentração do enxerto e rejeição podem ocorrer

com as técnicas de transplante endotelial (TARAVELLA; SHAH; DAVIDSON, 2013). A taxa de descolamento varia bastante (entre 1% a 82%), porém em média está abaixo de 3%. No caso do DMEK estas taxas também variam bastante juntamente com as taxas de *rebubbling*, pois pequenos descolamentos dos enxertos eram tratados de maneira diferentes: alguns cirurgiões optam por tratar sempre qualquer descolamento, enquanto outros apenas acompanham tal quadro. As taxas de rejeição no DSAEK / DSEK variam entre as séries, de 0% a 46%, entretanto a taxa média é de 10%. (TALAJIC; STRAIKO; TERRY, 2013).

Anshu *et al.* (2012) conduziram um estudo comparativo sobre as taxas de rejeição entre as técnicas DMEK, DSEK / DSAEK e transplante penetrante. A incidência de episódios de rejeição foi 0,7%, 9% e 17% respectivamente. Dessa forma, com a técnica DMEK havia 15 vezes menos chance de rejeição do que com a técnica DSEK e 20 vezes a menos do que com o transplante penetrante (FENG; PRICE; PRICE JR., 2013). A falência primária do enxerto é outra possível complicação. Nos transplantes penetrantes ela varia de menos de 1% a 3%. Com a técnica DSEK/DSAEK ela varia entre 0-29%, sugerindo que o trauma cirúrgico pode ser um dos principais responsáveis pela falência. Essa taxa tende a diminuir com o aumento da experiência dos cirurgiões. Price descreveu no DMEK uma taxa de falência primária de 8% na série inicial de 60 olhos e Dapena relatou 11 falências (9,2%) em uma série de 120 olhos (ANSHU *et al.*, 2012). A perda endotelial nos primeiros meses tende a ser maior com as técnicas de transplante endotelial, igualando-se em seguida a do penetrante. A média de perda endotelial entre as técnicas DSEK e DMEK é semelhante em seis meses e um ano (perda endotelial de 36%) (FENG; PRICE; PRICE JR., 2013). Por fim, o glaucoma secundário pode ocorrer com taxas variando de 0-54%. A etiologia inclui fechamento angular, inflamação e glaucoma cortisônico (DAPENA; HAM; MELLES, 2009).

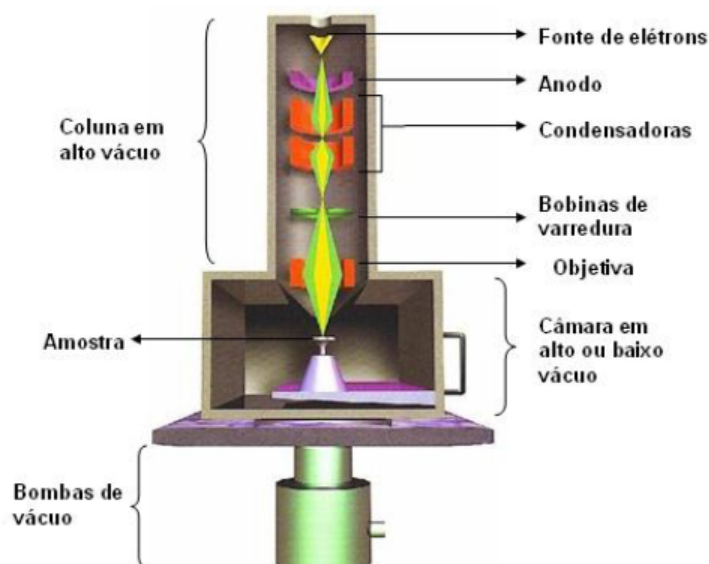
A mais recente fronteira no campo dos transplantes endoteliais é a engenharia de tecidos. Pesquisas têm sido desenvolvidas para cultivo “ex-vivo” de células endoteliais para posterior transplante, utilizando diversos arcabouços como suporte (quitosana, cápsula anterior do cristalino, etc.) (LAI; CHEN; HSIUE, 2007; HITANI *et al.*, 2008). Em outras técnicas, a presença de partículas magnéticas no cultivo endotelial, após estabelecimento de um campo magnético, posiciona-se na córnea (GROTTONE; PEREIRA; GOMES, 2012). O entendimento da fisiologia endotelial tem estimulado a criação de drogas que modificam o ciclo celular das

células endoteliais, promovendo recuperação das mesmas (WHIKEHART *et al.*, 2005; JOYCE, 2012). A substância "Rock inibithor" vem mostrando-se promissora na recuperação da transparência da córnea em casos de distrofia endotelial de Fuchs quando utilizada como colírio (OKUMURA *et al.*, 2012; KOIZUMI *et al.*, 2013).

3.1 Técnicas de microscopia

Para análise da superfície da córnea é rotineiro o uso da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Nesta técnica, um feixe de elétrons é gerado no canhão colimado dentro da coluna através de um sistema de lentes condensadoras e focalizado na amostra por meio de uma lente objetiva e sistema de bobinas de varredura. A interação do feixe com a amostra gera diversos sinais, devendo haver um detector adequado para que estes sinais sejam registrados. Atualmente, podem-se obter aumentos com este microscópio de um milhão de vezes com resolução de até um nanômetro (Figura 5) (MOREIRA, 2012).

Figura 5: Representação esquemática do microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Moreira (2012).

Por meio do uso da MEV já foi comparado cortes realizados com microcerátomo e laser de femtosegundo em diferentes profundidades e energias (SARAYBA *et al.*, 2007b; MEHTA *et al.*, 2008). Para análise há necessidade de preparo da amostra, o que pode modificar a estrutura da mesma. O modo ambiental

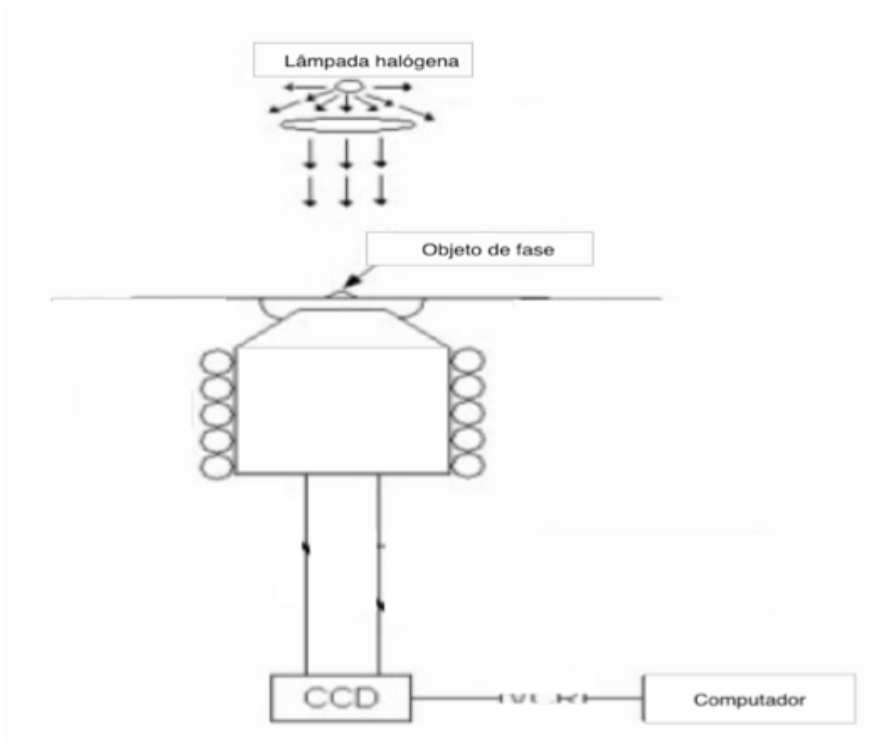
(*environmental*) não necessita desse preparo, porém é necessário acessório do microscópio de varredura para realização da técnica (ZIEBARTH *et al.*, 2014). A avaliação das imagens é realizada de forma qualitativa, o que pode gerar viés pela subjetividade. Podem-se utilizar programas matemáticos para análise quantitativa dessas superfícies na tentativa de objetivar o estudo, porém tal artifício é uma extrapolação, estando sujeito ao erro. Além disso, existem técnicas de captura com o microscópio de varredura em que se pode tentar reconstruir a superfície de maneira tridimensional, realizando-se angulações da amostra (MARIAN *et al.*, 2013).

Uma alternativa inovadora para análise dessas superfícies é o uso da Microscopia de Desfocalização (MD). Ela é uma técnica de microscopia óptica que foi desenvolvida no Laboratório de Física Biológica do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. Ela permite a observação de objetos de fase por um microscópio operando em campo claro. Estes ao serem atravessados por um feixe de luz modificam a fase e não a amplitude da luz, gerando um contraste na imagem. Objetos de fase não são visíveis quando se encontram no plano focal da objetiva, por isso um microscópio convencional possui usualmente sistemas para gerar contraste nestas amostras (Figura 6) (COELHO NETO *et al.*, 2006). Os materiais biológicos, como a córnea, se comportam como objetos de fase ao serem observados num microscópio óptico. Assim, utilizando a MD é possível obter dados quantitativos como forma, volume, reconstrução tridimensional e índice de refração de diversos tipos de estruturas, mesmo em nível celular, como, por exemplo, os macrófagos e as hemácias. Com esta ferramenta pode ser possível a obtenção de índices de rugosidade que facilitam a comparação das amostras, além da análise ser realizada sem o preparo das mesmas, o que poderia alterar suas características (AGERO *et al.*, 2003; AGERO *et al.*, 2004).

A técnica de microscopia de desfocalização utiliza basicamente um microscópio óptico invertido. Neste, tem-se um sistema de controle de foco (*Perfect Focus System* – PFS), que mantém estável a posição focal desejada. Além disso, acoplada à saída do microscópio existe uma câmera responsável pela captura de imagens. Esta fornece imagens formadas por *pixels* com diferentes níveis de cinza. No entanto, todos os resultados da MD são obtidos a partir do contraste de intensidade de luz e, portanto, é sempre necessário fazer uma transformação do nível de cinza (N) dos *pixels* em intensidade de luz (I). Para obter contraste de intensidade deve-se encontrar a relação entre (N) e (I), que é obtida através de uma

curva de calibração, na qual são coletados pares de intensidade de luz e nível de cinza para diferentes níveis de iluminação do microscópio. Após a conversão do nível de cinza em contraste, obtêm-se então imagens representando o contraste de intensidade das córneas desfocalizadas (GOMES, 2013).

Figura 6: Representação do funcionamento da técnica de microscopia de desfocalização.

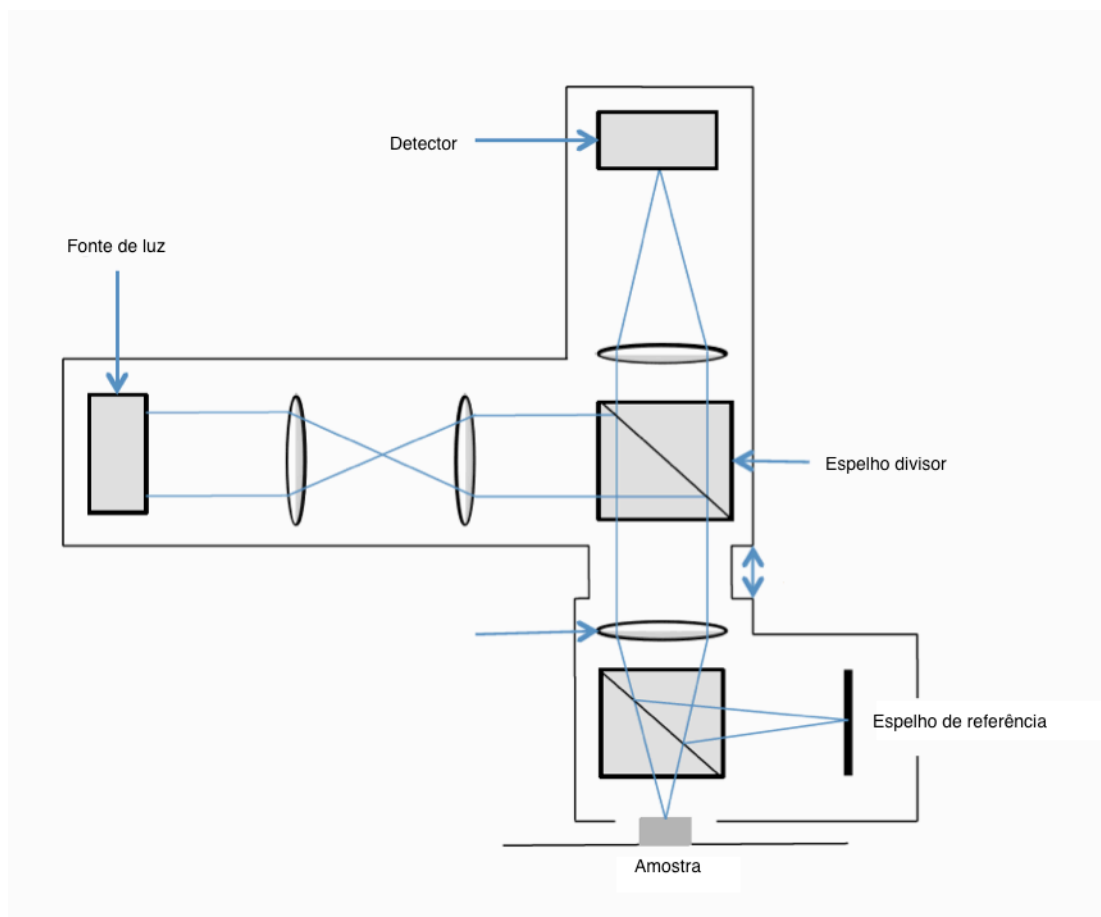


Fonte: Adaptado de Agero *et al.* (2004).

Por fim, uma alternativa para análise de superfícies é a perfilometria óptica. Consiste em uma técnica que permite obter informações da ordem de um décimo de nanômetro na direção z (altura) e pode ser empregada para os mais diversos tipos de superfícies de forma reproduzível, independentemente do tamanho da área varrida. Índices de rugosidade podem ser obtidos e facilitam a comparação entre as amostras (ZYGO CORPORATION, 2011). Baseia-se na interferometria, na qual a luz branca emitida por uma fonte interna do microscópio é dividida em dois ramos por um divisor de feixes e enviada por dois caminhos ópticos: um que incide sobre uma superfície de referência, em geral um espelho ultra liso e retorna para um detector e outro que incide sobre a superfície em inspeção e é também enviada de volta para o detector. A sobreposição destes dois feixes sobre o detector gera franjas de

interferência, com regiões claras e escuras, com alta e baixa intensidade luminosa, respectivamente. Estas diferenças nas intensidades das franjas se devem às diferenças de fase relativas entre as frentes de ondas advindas do espelho de referência e da superfície da amostra. A origem destas fases relativas repousa justamente nas irregularidades da superfície da amostra em relação à superfície lisa da referência, ou seja, na diferença do caminho óptico percorrido pelas frentes de onda. (Figura 7). Através do emprego da interferometria por varredura de fase é possível transformar estas diferenças de fase em variações de altura (GROOT, 1993; GROOT, 2011).

Figura 7: Representação do funcionamento da técnica de perfilometria óptica.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Desse modo, foi realizada a análise de córneas humanas preparadas através de três técnicas de transplante endotelial e suas variações (DSEK, DSAEK e DMEK), por meio da microscopia eletrônica de varredura, microscopia de desfocalização e perfilometria óptica.

4 METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com o número CAAE 09080513.3.0000.5149 através da Plataforma Brasil (Anexo B).

As córneas utilizadas foram descartadas pelo Banco de Olhos do MG Transplantes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) para transplante clínico devido sorologia positiva para hepatite B, C ou HIV. As amostras apresentavam contagem endotelial acima de 1700 células por mm^2 e tempo entre preservação e preparo para o experimento menor do que 10 dias. Como critérios de exclusão não foram aceitas córneas descartadas por tempo superior a 10 dias de preservação e também aquelas classificadas biomicroscopicamente como inviáveis para transplante devido a edema estromal e presença de dobras intensas (córneas tectônicas). Além disso, não foram aceitas córneas cuja temperatura de conservação encontrava-se acima de 5°C no momento da sua entrada no banco de olhos. Durante o transporte para os experimentos foi mantida a temperatura de conservação inferior a 5°C em meio comercial Optisol (Bausch Lomb, Nova Iorque, EUA). O termo de consentimento para doação de órgãos prevê que córneas impróprias para transplante clínico podem ser utilizadas para pesquisa e treinamento, conforme legislação vigente no Brasil (Anexo A).

As córneas foram então divididas em cinco grupos: DMEK, DSAEK 1, DSAEK 2, DSEK 1 e DSEK 2. O cálculo amostral foi realizado no *software* G* Power 3.1.3. Foi considerado o nível de significância menor igual a 0,05 (valor de p). O poder estatístico foi considerado de oitenta por cento. Em estudo-piloto foram estabelecidos valores de média e desvio-padrão para todas as variáveis. Cinco córneas em cada grupo seriam de tamanho amostral suficiente para evidenciar diferenças caso elas existissem, à exceção da microscopia de desfocalização. Nessa técnica, o número mínimo de córneas deveria ser 10 por grupo. As análises foram realizadas nos *softwares* R versão 3.0.2 e SPSS versão 19. Foi considerado nível de significância de 5%.

No grupo DSEK 1, as amostras foram montadas em câmara artificial (K20-2125, Katena, Denville, EUA) sendo necessário para isso que a aba escleral da córnea doadora possuísse dois milímetros (mm). A câmara artificial foi preenchida com solução salina balanceada (BSS-Alcon, São Paulo, Brasil). Realizou-se

paquimetria central (SKU-5100, Accutome, Malvern, EUA) para início da dissecação lamelar. Foi calculado setenta por cento da espessura encontrada e esse valor foi utilizado no bisturi de diamante regulável Duckworth & Kent (Baldock, Inglaterra). Utilizou-se o instrumental pré-delaminador (Odous, Belo Horizonte, Brasil) para determinar o início do plano de dissecação lamelar, que foi complementado com a pinça Suarez-Spreader (Odous, Belo Horizonte, Brasil). Em seguida, foram utilizadas espátulas (1337, Rumex, Clearwater, EUA) para confecção do plano de dissecação lamelar. Na etapa seguinte, o enxerto foi trepanado com diâmetro de oito milímetros, sendo o lado endotelial identificado com uso de papel de nitrocelulose (trepanado centralmente 3 mm). No grupo DSEK 2, realizaram-se os mesmos procedimentos do grupo DSEK 1, sendo a única diferença que o percentual calculado para início da dissecação foi de noventa por cento da paquimetria central.

No grupo DSAEK 1, as amostras foram montadas na câmara artificial Malks (Loktal, São Paulo, Brasil) sendo esta preenchida por BSS. As córneas também deveriam ter dois milímetros de aba escleral. A pressão na câmara artificial foi elevada até 80 mmHg, utilizando-se do medidor de pressão intracamerar. Foi realizada marcação central com caneta de violeta de genciana para orientar trepanação. Marcas periféricas assimétricas também foram feitas para reposicionamento da lamela corneana após o corte. Utilizou-se a cabeça do microcerátomo Masyk (Loktal, São Paulo, Brasil) de quatrocentos micrômetros, única disponível para este trabalho. Após o corte, a lamela dissecada (*free cap*) foi reposicionada conforme marcação. Trepanação central de oito milímetros foi realizada. O lado endotelial foi identificado com uso de papel de nitrocelulose (trepanado centralmente 3 mm).

No grupo DSAEK 2, as córneas foram montadas em câmara artificial da marca Moria (Doylestown, EUA). A aba escleral também deveria medir 2 mm. Com auxílio do tonômetro de Barraquer estimou-se a pressão na câmara artificial como acima de 60 mmHg. Foi realizada marcação central com caneta de violeta de genciana para orientar trepanação. Marcas periféricas assimétricas também foram feitas para reposicionamento da lamela corneana após o corte. Realizou-se paquimetria central com paquímetro Accutomee caso acima de 550 micrômetros utilizou-se a cabeça do microcerátomo de 350 micrômetros. Caso inferior, utilizou-se a cabeça de 300 micrômetros. A etapa seguinte foi a de trepanação do enxerto com

diâmetro de oito milímetros. O lado endotelial foi identificado com uso de papel de nitrocelulose (trepanado centralmente 3 mm).

No quinto grupo foi realizada a técnica DMEK. A membrana de Descemet e endotélio corneano foram descolados 360 graus na região do seio camerular com auxílio de gancho Sinsky (Odous, Belo Horizonte, Brasil). Em seguida, ampliou-se o descolamento em direção a área central da córnea com pinças, após coloração com azul de Tripan 0,1% (Ophthalmos, São Paulo, Brasil). Realizou-se trepanação de oito milímetros da área central parcialmente (não atingindo o estroma médio). O descolamento foi completado com auxílio de pinças. Uma membrana de nitrocelulose (trepanada centralmente em três milímetros) foi aderida ao lado endotelial para facilitar identificação da mesma e manter o enxerto sem enrolar-se.

Após o preparo das amostras através das cinco técnicas citadas anteriormente, a primeira forma de avaliação da superfície desses enxertos foi através da microscopia de desfocalização, de tal forma que as amostras foram mantidas no próprio meio de preservação durante a análise.

4.1 Utilização da microscopia de desfocalização

Os experimentos de microscopia de desfocalização foram realizados no laboratório de Física de Sistemas Biológicos do Departamento de Física (Instituto de Ciências Exatas – ICEX) da UFMG, utilizando o microscópio invertido (Nikon Eclipse, Nova Iorque, EUA). Nesse, tem-se um sistema de controle de foco (PFS – *Perfect Focus System*) que mantém estável a posição focal desejada. Acoplado à saída do microscópio tem-se uma câmera (UNIQ UP1800 CL, Santa Clara, EUA), que é responsável pela captura de imagens, sendo a taxa de aquisição utilizada de 15 quadros por segundo (fps). Os experimentos foram realizados utilizando-se objetivas com três diferentes fatores de ampliação: 10x, 20x e 40x. A área capturada foi de 0,59 mm², 0,15 mm² e 0,038 mm², respectivamente.

O experimento da microscopia de desfocalização consistiu basicamente na coleta de imagens/filmes da superfície da córnea, preparada para transplante endotelial, em diferentes desfocalizações. A desfocalização era feita movendo-se a objetiva, portanto o plano focal. Para cada desfocalização era obtida uma imagem média a partir de um filme de 50 quadros.

Para o processamento das imagens era utilizado o programa Image J

(*software* livre do NIH) e o perfil das córneas era obtido através do programa Matlab (MathWorks, Natic). Em cada amostra analisada foram obtidos parâmetros de rugosidade, como o índice de rugosidade 1 e 2 da microscopia de desfocalização (MD), que permitiram comparação objetiva das superfícies evitando-se o viés da subjetividade.

O índice de rugosidade 1 da microscopia de desfocalização foi obtido a partir da diferença entre as alturas obtidas e a média, dividido pela área analisada. Já o índice de rugosidade 2 da microscopia de desfocalização foi obtido à semelhança do cálculo para desvio padrão. Em ambos os índices, as alturas dos perfis são obtidas a partir da expressão abaixo:

$$C(x,y) = \frac{I - I_0}{I_0} = \Delta n \Delta f \nabla^2 h(x,y),$$

Através da câmera acoplada ao microscópio consegue-se obter relação entre nível de cinza dos *pixels* e intensidade de luz (I). A variação entre os índices de refração (delta n) é obtida pela diferença entre o índice de refração da córnea e do meio onde está imersa. Por fim, através do sistema de controle de foco obtêm-se as diferenças entre as posições focais (delta f). Dessa maneira é encontrada a variação de altura (h).

Em seguida, as mesmas amostras foram enviadas para preparo para análise através de microscopia eletrônica de varredura.

4.2 Utilização da microscopia eletrônica de varredura

A fixação primária das amostras foi realizada com o meio Karnovsky por 24 horas. Em seguida, foram lavadas e armazenadas no tampão cacodilato. Para análise pelo microscópio eletrônico de varredura, as amostras passaram por fixação secundária em tetróxido de ósmio, lavadas com cacodilato, imersas em ácido tânico, novamente lavadas com cacodilato, imersas em tetróxido de ósmio, lavadas com água destilada, desidratadas em concentração crescente de álcool etílico, passagem por ponto crítico, montagem em stub e metalização com ouro (Anexo C).

Os espécimes foram analisados no microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200, FEI, Hillsboro, EUA) disponível no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais nas ampliações de 20x, 350x e 1000x. Para análise qualitativa, três observadores mascarados classificaram as superfícies em 3 grupos através da imagem de 350x, utilizando-se de imagens-padrão (Apêndice A): grupo 1 – superfície rugosa; grupo 2 – superfície intermediária; grupo 3 – superfície lisa. Realizou-se análise comparativa entre os grupos para avaliação de diferenças. Além do critério qualitativo foi realizada análise quantitativa através de reconstrução pelo software Image J. Foi obtida média aritmética dos níveis de cinza para cada amostra.

4.3 Utilização da perfilometria óptica

Após obtenção de imagens com o microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram analisadas com o perfilômetro óptico (Zygo 7300 New View, Middlefield, EUA) disponível no departamento de física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando-se da rotina *Advanced Texture*. As aquisições podem ser feitas com cinco aumentos diferentes: 2.5x, 5x, 25x, 50x e 100x. Sucessivamente, em cada um dos aumentos a área varrida é de $(2.2 \times 2.2) \text{ mm}^2$, $(1.1 \times 1.1) \text{ mm}^2$, $(0.44 \times 0.44) \text{ mm}^2$, $(0.22 \times 0.22) \text{ mm}^2$ e $(0.11 \times 0.11) \text{ mm}^2$, respectivamente. Vários são os parâmetros que podem ser obtidos de uma varredura perfilométrica, como rugosidade média (R_a), rugosidade quadrática média (R_q) e altura máxima de um padrão de rugosidade (R_{max}).

4.4 Ferramentas estatísticas

A comparação entre as técnicas de transplante endotelial por meio da classificação subjetiva realizada através do microscópio eletrônico de varredura foi realizada a partir da extensão do teste Exato de Fisher.

Já para comparação das características quantitativas entre as técnicas de preparo para transplante endotelial foi realizado o teste F (ANOVA), uma vez que a normalidade e homocedasticidade foram atendidas. Isto foi verificado utilizando o teste de Shapiro-Wilk para normalidade e o de Levene para homocedasticidade. As

comparações das técnicas duas a duas foram realizadas por meio do teste post-hoc Tukey.

A concordância entre os três observadores em relação à classificação subjetiva analisada pelo microscópio eletrônico de varredura foi avaliada através do coeficiente Kappa. Para índices menores do que 0,20 a força de concordância é fraca, entre 0,21 e 0,40 regular, 0,41 e 0,60 moderada e entre 0,81 e 1,00 muito boa. A correlação de concordância entre as técnicas foi realizada com a estimação do coeficientes de correlação de Spearman (s). Este coeficiente quantifica tendência de crescimento ou decréscimo entre um par de variáveis numéricas, variando de -1 a +1 se este for próximo aos extremos, significando que há correlação decrescente (se próximo a -1) ou crescente (se próximo a +1).

5 RESULTADOS

Foram analisadas um total de trinta e uma córneas, sendo seis do grupo DMEK, cinco DSAEK1, seis DSAEK 2, oito DSEK 1 e seis DSEK 2. Em duas amostras do grupo DSAEK 1 não foi possível obter os valores dos índices de rugosidade da MD por problemas das imagens capturadas, inviabilizando a reconstrução. Porém, isso não comprometeu a análise dessas amostras com as demais técnicas (MEV e perfilometria óptica). Em uma das amostras na técnica DSEK 1 o posicionamento inclinado da mesma também impossibilitou a captura das imagens na MD.

5.1 Análise por meio da microscopia de desfocalização

A primeira análise das superfícies dos enxertos foi feita através da microscopia de desfocalização. As amostras permaneceram no meio de preservação Optisol. A partir das reconstruções das imagens com aumento de 20x (Apêndice B – Figuras 10 a 14) foram calculados os índices de rugosidade da MD 1 e 2 para cada amostra de acordo com a técnica utilizada para o preparo das mesmas (Tabela 1).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as técnicas de preparo para transplante endotelial utilizando-se os dois índices obtidos com a microscopia de desfocalização. (Tabela 1 – $p=0,190$ e $0,089$ – ANOVA). Porém, nos gráficos de dispersão unidimensional (gráficos 1 e 2), observou-se uma tendência na média da técnica DMEK ser inferior às demais.

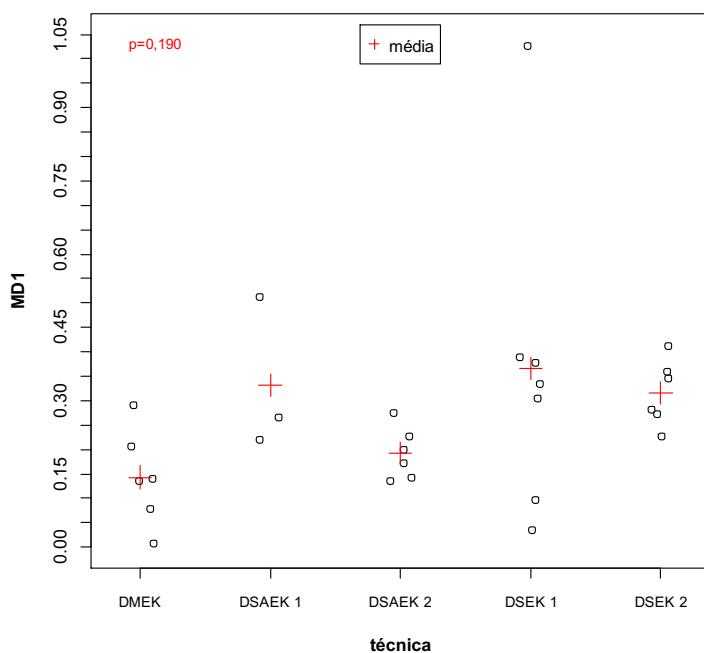
Tabela 1: Resumo dos índices obtidos à microscopia de desfocalização, microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica.

técnica	microscopia de desfocalização		microscopia eletrônica de varredura	perfilometria óptica	
	MD1	MD2	MEV	Ra (µm)	Rq* (µm)
DMEK					
n	6	6	6	6	6
média	0,143	0,156	9,463	0,039	0,074
mediana	0,138	0,163	8,613	0,037	0,055
mínimo	0,008	0,032	4,979	0,016	0,028
máximo	0,291	0,306	18,468	0,079	0,215
desvio-padrão	0,099	0,104	4,870	0,022	0,070
DSAEK 1					
n	3	3	5	5	5
média	0,332	0,435	24,719	0,687	0,994
mediana	0,265	0,360	22,626	0,740	1,007
mínimo	0,219	0,285	19,208	0,481	0,669
máximo	0,512	0,661	35,095	0,969	1,344
desvio-padrão	0,158	0,199	6,278	0,206	0,292
DSAEK 2					
n	6	6	6	6	6
média	0,192	0,259	17,596	0,403	0,595
mediana	0,186	0,256	17,184	0,396	0,578
mínimo	0,136	0,190	14,623	0,237	0,353
máximo	0,276	0,357	21,288	0,564	0,862
desvio-padrão	0,053	0,064	2,239	0,134	0,244
DSEK 1					
n	7	7	8	8	8
média	0,366	0,493	29,191	0,606	0,911
mediana	0,335	0,450	28,746	0,662	0,958
mínimo	0,035	0,081	22,710	0,232	0,339
máximo	1,027	1,337	36,297	1,054	1,621
desvio-padrão	0,323	0,409	5,365	0,268	0,436
DSEK 2					
n	6	6	6	6	6
média	0,316	0,428	25,812	0,534	0,863
mediana	0,314	0,431	25,228	0,600	0,981
mínimo	0,226	0,322	19,779	0,276	0,396
máximo	0,413	0,537	32,088	0,689	1,093
desvio-padrão	0,068	0,080	5,317	0,156	0,278
p	0,190 ^a	0,089 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a

Legenda: (a) Análise de Variância (ANOVA); (*) usou-se a transformação logarítmica para o adequado uso da ANOVA; DMEK – *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*; DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*; DSEK – *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty* µm (micrômetros); n-número de amostras; MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura; Ra-índice de rugosidade média; Rq-Índice de rugosidade média quadrática.

Fonte: Elaborado pelo autor.

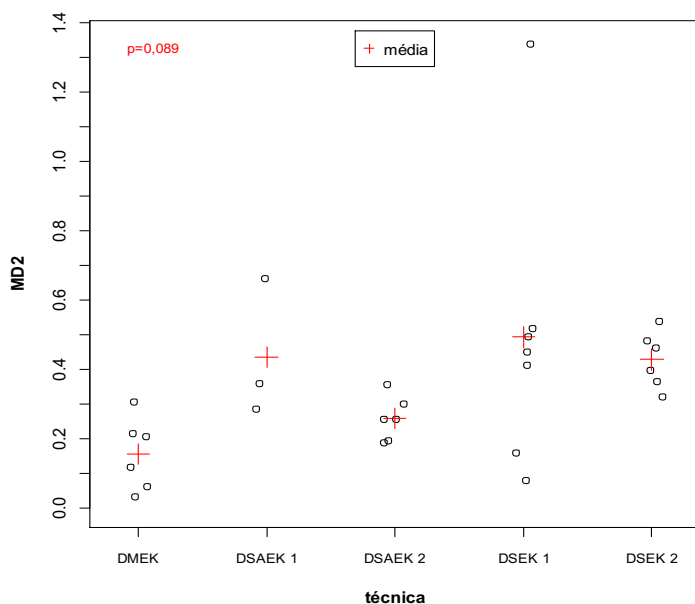
Gráfico 1: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade 1 obtido na técnica microscopia de desfocalização.



Legenda: DMEK – Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty; DSAEK – Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSEK – Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty μm (micrômetros); + representa a média.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 2: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade 2 obtido na técnica de microscopia de desfocalização.



Legenda: DMEK – Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty; DSAEK – Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSEK – Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty μm (micrômetros); + representa a média.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Análise por meio da microscopia eletrônica de varredura

Em seguida, as mesmas amostras foram analisadas através do microscópio eletrônico de varredura nos aumentos de 20x, 350x e 1000x. Para captura das imagens em maior aumento foi considerada apenas a área dentro dos dois milímetros centrais (Apêndice B – Figuras 15 a 19). A classificação subjetiva foi realizada de acordo com imagens pré-definidas (Apêndice A) como padrão 1 (rugoso), padrão 2 (intermediário) e padrão 3 (liso). Obteve-se então a correlação de concordância entre os observadores, seguida da comparação entre as técnicas (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Foi também realizada classificação das amostras a partir do nível de cinza das imagens através da elaboração de um *plug in* no programa Image J (Gráfico 3 e Tabela 1).

A partir da tabela 2 nota-se que houve uma boa correlação entre os examinadores na análise subjetiva através da microscopia eletrônica de varredura (índice Kappa variando entre 0,600 a 0,800).

Tabela 2: Correlação entre observadores para o índice qualitativo de rugosidade através da microscopia eletrônica de varredura.

		observador 2 (MEV)			Total	Kappa	Valor p
observador 1 (MEV)	rugoso	intermediário	liso				
rugoso	9 (29,0%)	-	-	9 (29,0%)	0,704	<0,001	
intermediário	4 (12,9%)	10 (32,3%)	-	14 (45,2%)			
liso	-	2 (6,5%)	6 (19,4%)	8 (25,8%)			
Total	13 (41,9%)	12 (38,7%)	6 (19,4%)	31 (100,0%)			

		observador 3 (MEV)			Total	Kappa	Valor p
observador 1 (MEV)	rugoso	intermediário	liso				
rugoso	8 (25,8%)	1 (3,2%)	-	9 (29,0%)	0,605	<0,001	
intermediário	5 (16,1%)	9 (29,0%)	-	14 (45,2%)			
liso	-	2 (6,5%)	6 (19,4%)	8 (25,8%)			
Total	13 (41,9%)	12 (38,7%)	6 (19,4%)	31 (100,0%)			

		observador 3 (MEV)			Total	Kappa	Valor p
observador 2 (MEV)	rugoso	intermediário	liso				
rugoso	10 (32,3%)	3 (9,7%)	-	13 (41,9%)	0,696	<0,001	
intermediário	3 (9,7%)	9 (29,0%)	-	12 (38,7%)			
liso	-	-	6 (19,4%)	6 (19,4%)			
Total	13 (41,9%)	12 (38,7%)	6 (19,4%)	31 (100,0%)			

Legenda: (*) intervalo com 95% de confiança para o coeficiente de concordância Kappa; DMEK – *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*; DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*; DSEK – *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 3 aponta que houve diferença significativa apenas entre a técnica DMEK e as demais ($p < 0,05$ -Teste exato de Fisher). Comparando todas as outras técnicas entre si não foi observada diferença (Tabela 4 $p = 0,209$ – teste exato de Fisher).

Tabela 3: Distribuição do índice qualitativo de rugosidade através da microscopia eletrônica de varredura segundo a técnica de preparo.

técnica	MEV						Total	p	
	rugoso		intermediário		liso				
DMEK	-	-	-	-	6	100,0%	6	19,4%	<0,001 ^b
DSAEK 1	1	9,1%	4	28,6%	-	-	5	16,1%	
DSAEK 2	1	9,1%	5	35,7%	-	-	6	19,4%	
DSEK 1	5	45,5%	3	21,4%	-	-	8	25,8%	
DSEK 2	4	36,4%	2	14,3%	-	-	6	19,4%	
Total	11	100,0%	14	100,0%	6	100,0%	31	100,0%	

Legenda: (*) Extensão do teste exato de Fisher; DMEK – *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*; DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*; DSEK – *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty*; MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4: Comparação entre as técnicas com estroma residual através do índice qualitativo de rugosidade da microscopia eletrônica de varredura.

técnica	MEV						Total	p	
	rugoso		intermediário		liso				
DSAEK 1	1	9,1%	4	28,6%	-	-	5	20,0%	0,209 ^b
DSAEK 2	1	9,1%	5	35,7%	-	-	6	24,0%	
DSEK 1	5	45,5%	3	21,4%	-	-	8	32,0%	
DSEK 2	4	36,4%	2	14,3%	-	-	6	24,0%	
Total	11	100,0%	14	100,0%	-	-	25	100,0%	

Legenda: (*) Extensão do teste exato de Fisher; DMEK – *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*; DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*; DSEK – *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty*; MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5: Comparação entre as técnicas com estroma residual (outras) e DMEK através do índice qualitativo de rugosidade da microscopia eletrônica de varredura.

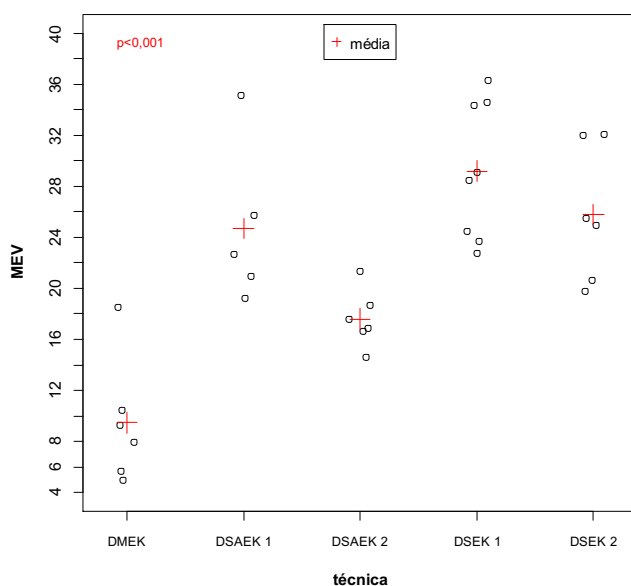
Técnica	índice qualitativo de rugosidade (MEV)						Total	p	
	rugoso		intermediário		liso				
DMEK	-	-	-	-	6	100,0%	6	19,4%	<0,001 ^b
outras	11	100,0%	14	100,0%	-	-	25	80,6%	
Total	11	100,0%	14	100,0%	6	100,0%	31	100,0%	

Legenda: (*) Extensão do teste exato de Fisher; DMEK – *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*; outras técnicas com estroma residual.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise através dos níveis de cinza da MEV observou-se diferença estatística entre a técnica DMEK, DSAEK 1, DSEK 1 e DSEK 2 (Gráfico 3 e tabela 6 $P < 0,05$ – Tukey). Não foi observada diferença significativa entre a técnica DMEK e DSAEK 2 ($p = 0,062$). Foi observada ainda diferença entre a técnica DSAEK 2 e DSEK 1, com menor rugosidade na primeira técnica.

Gráfico 3: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade obtido por meio de nível de cinza através da técnica de microscopia eletrônica de varredura.



Legenda: DMEK – *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*; DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*; DSEK – *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty*; μm (micrômetros); + representa a média; MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6: Resultados das comparações dos índices de rugosidade entre as técnicas segundo método de comparação múltipla de Tukey.

MEV		Ra		Rq	
conclusão	p	conclusão	p	conclusão	p
DMEK < DSAEK 1	<0,001	DMEK < DSAEK 1	<0,001	DMEK < DSAEK 1	<0,001
DMEK = DSAEK 2	0,062	DMEK < DSAEK 2	0,017	DMEK < DSAEK 2	<0,001
DMEK < DSEK 1	<0,001	DMEK < DSEK 1	<0,001	DMEK < DSEK 1	<0,001
DMEK < DSEK 2	<0,001	DMEK < DSEK 2	0,001	DMEK < DSEK 2	<0,001
DSAEK 1 = DSAEK 2	0,158	DSAEK 1 = DSAEK 2	0,112	DSAEK 1 = DSAEK 2	0,395
DSAEK 1 = DSEK 1	0,525	DSAEK 1 = DSEK 1	0,937	DSAEK 1 = DSEK 1	0,976
DSAEK 1 = DSEK 2	0,996	DSAEK 1 = DSEK 2	0,650	DSAEK 1 = DSEK 2	0,984
DSAEK 2 < DSEK 1	0,002	DSAEK 2 = DSEK 1	0,278	DSAEK 2 = DSEK 1	0,632
DSAEK 2 = DSEK 2	0,058	DSAEK 2 = DSEK 2	0,736	DSAEK 2 = DSEK 2	0,674
DSEK 1 = DSEK 2	0,719	DSEK 1 = DSEK 2	0,949	DSEK 1 = DSEK 2	>0,999

Legenda: DMEK – *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*; DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*; DSEK – *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty* μm (micrômetros).

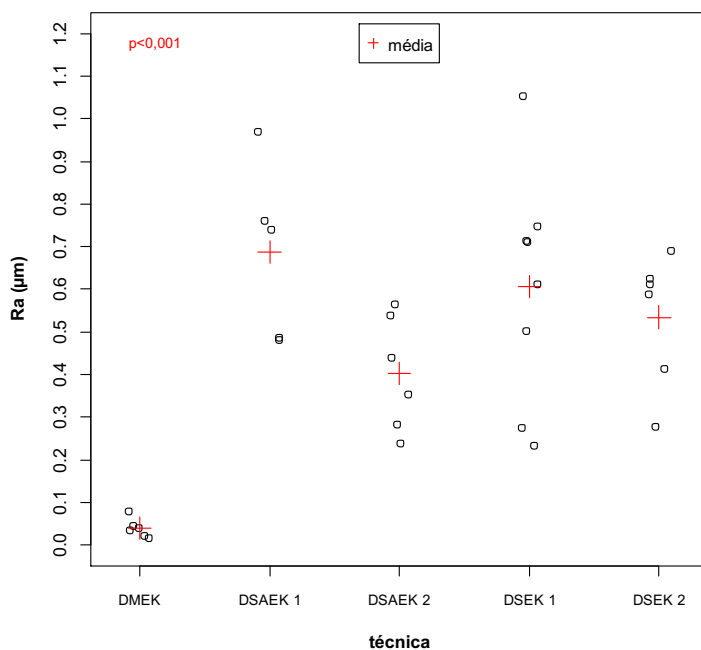
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Análise por meio da perfilometria óptica

As amostras foram analisadas no perfilômetro óptico (Apêndice B – Figuras 20 a 24), obtendo-se os índices Ra (rugosidade média) e Rq (rugosidade média quadrática) (Tabela 6 e Gráficos 4 e 5).

Nos Gráficos 4 e 5 e na Tabela 6, observa-se que houve diferença entre a técnica DMEK e todas as outras ($p < 0,05$). Comparando-se as demais técnicas não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

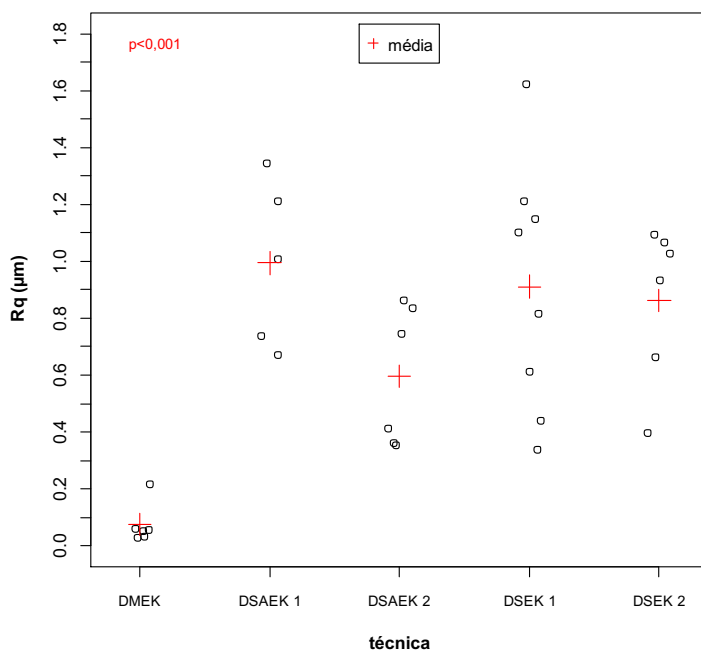
Gráfico 4: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade Ra (μm) obtido na perfilometria óptica.



Legenda: DMEK – Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty; DSAEK – Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSEK – Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty; μm – micrômetro; Ra-índice de rugosidade média.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 5: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade Rq (μm) obtido na perfilometria óptica.



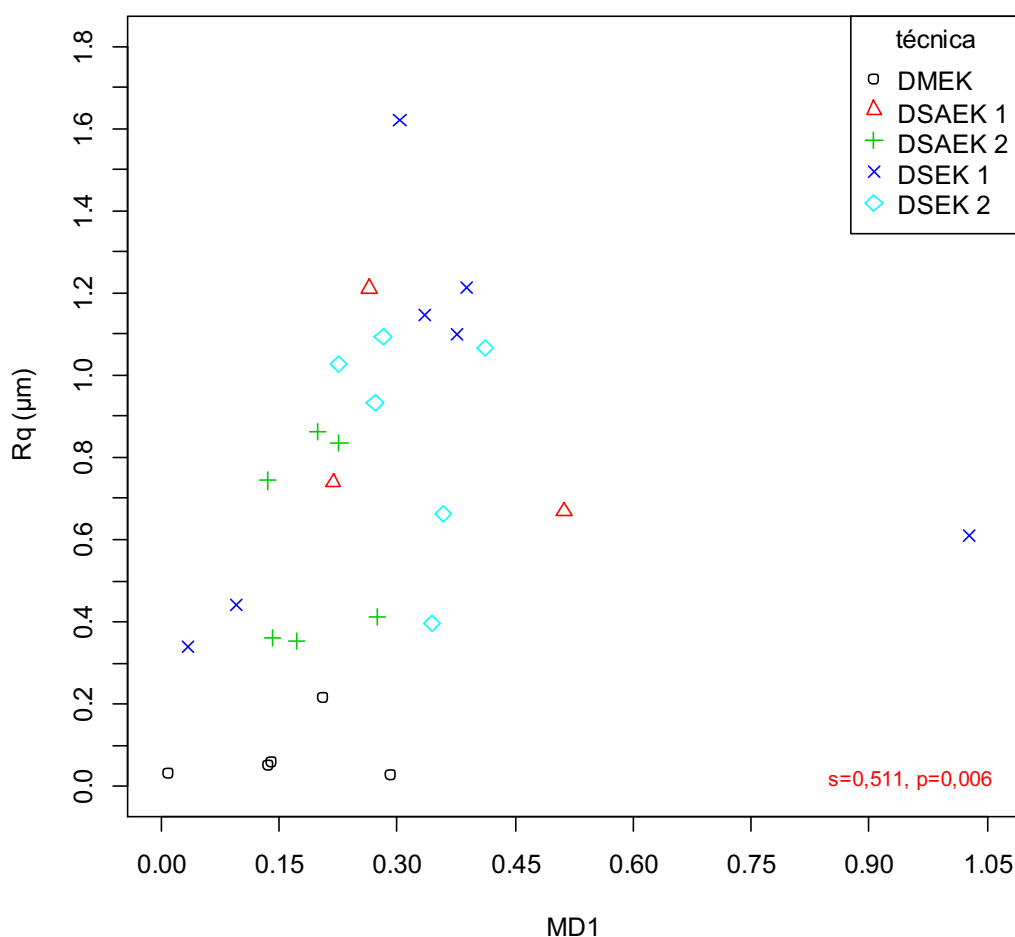
Legenda: DMEK – Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty; DSAEK – Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSEK – Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty; μm – micrômetro; Rq-índice de rugosidade média quadrática.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Correlação entre as técnicas de análise das superfícies corneanas

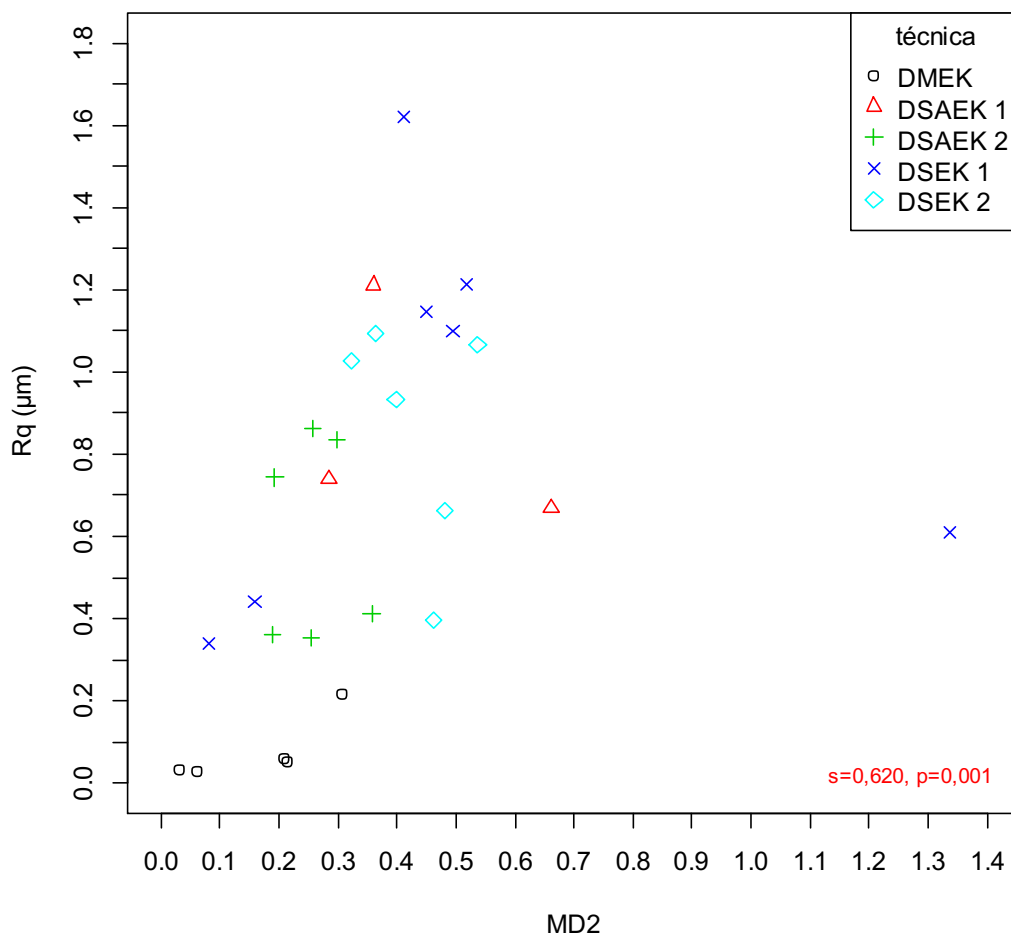
Por fim, foi realizada correlação de concordância entre o índice de rugosidade R_q e os demais índices através do coeficiente de Spearman(s) (Gráficos 6,7 e 8). Foi observada correlação crescente entre os testes, obtendo-se valores de 0,511, 0,620 e 0,501 na correlação com os índices da microscopia de desfocalização e com índices objetivos da MEV.

Gráfico 6: Diagrama de dispersão bidimensional entre os índices de rugosidades R_q (μm) e índice de rugosidade 1 da microscopia de desfocalização.



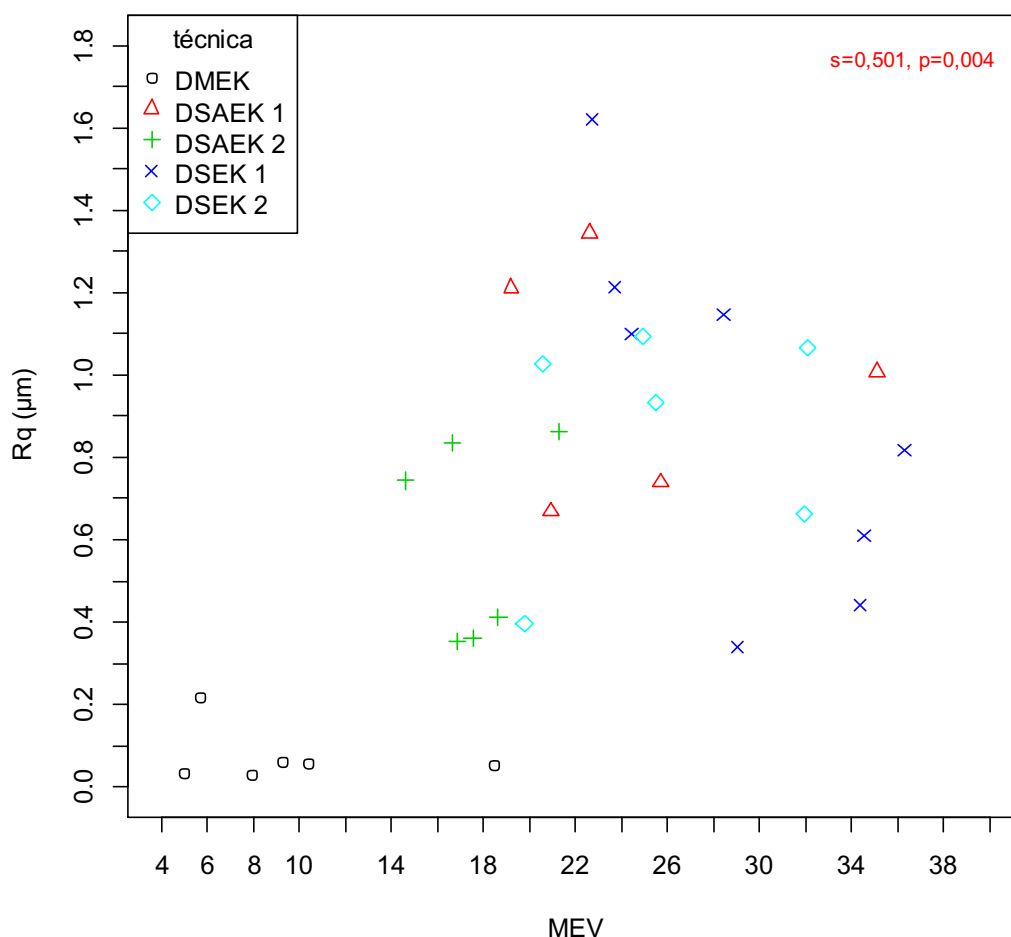
Legenda: DMEK – Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty; DSAEK – Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSEK – Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty; R_q – Rugosidade média quadrática; s – coeficiente de correlação de Spearman; μm – micrômetro.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 7: Diagrama de dispersão bidimensional entre o índice de rugosidade Rq (μm) e índice de rugosidade 2 da microscopia de desfocalização.



Legenda: DMEK – Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty; DSAEK – Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSEK – Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty; Rq – Rugosidade média quadrática; s – coeficiente de correlação de Spearman; μm – micrômetro.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 8: Diagrama de dispersão bidimensional entre os índices de rugosidades Rq (μm) e os índices objetivos da microscopia eletrônica de varredura.



Legenda: DMEK – Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty; DSAEK – Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSEK – Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty; Rq – Rugosidade média quadrática; s – coeficiente de correlação de Spearman; μm – micrômetro.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi realizada correlação também entre o índice Rq e a classificação subjetiva pela MEV (Tabela 7 e Gráfico 9). Observou-se que para amostras classificadas como lisas havia correlação com os menores índices de Rq ($p<0,001$). O mesmo não foi observado para amostras classificadas como intermediário e rugoso, nas quais não se observou diferença significativa para o índice Rq ($p=0,924$).

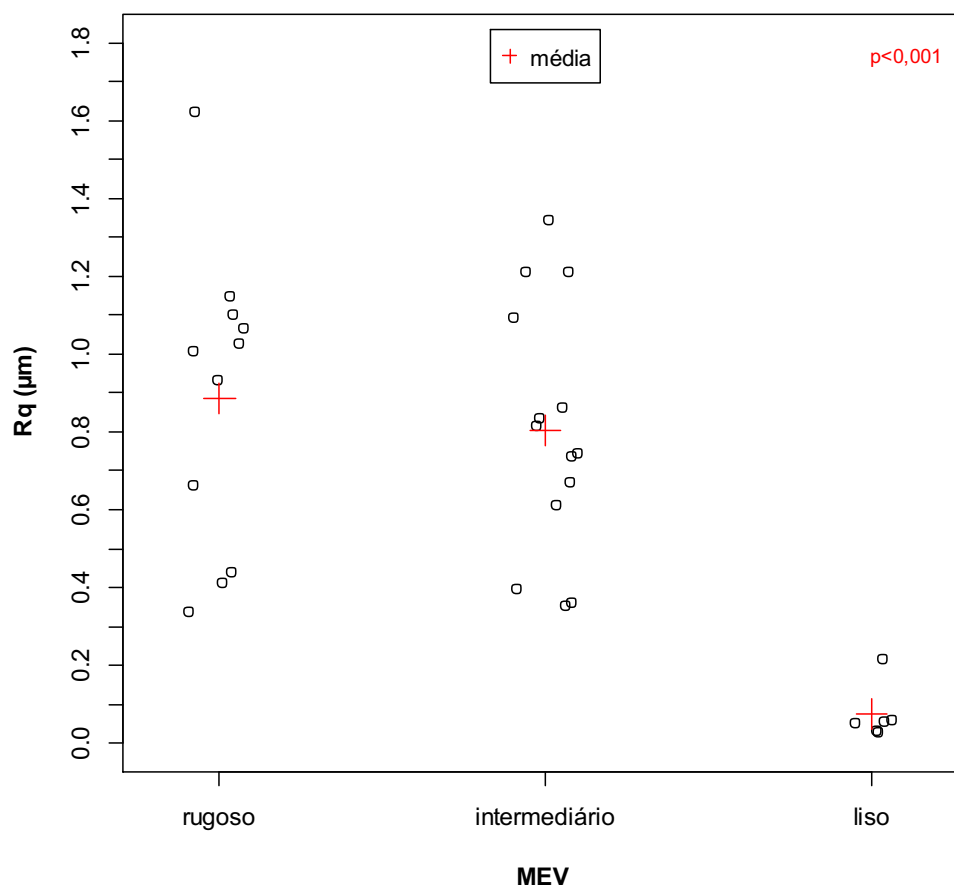
Tabela 7: Relação entre o índice de rugosidade Rq (μm) e o índice qualitativo de rugosidade da microscopia eletrônica de varredura.

MEV	Rq* (μm)					
	n	média	mediana	mínimo	máximo	desvio-padrão
rugoso	11	0,887	1,007	0,339	1,621	0,387
intermediário	14	0,803	0,780	0,353	1,344	0,321
liso	6	0,074	0,055	0,028	0,215	0,070
$p < 0,001^a$						

Legenda: (a) Análise de Variância (ANOVA) com um Fator Fixo, (*) usou-se a transformação logarítmica para o adequado uso da ANOVA; Rq – Rugosidade média quadrática; MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura; μm – micrômetro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 9: Diagrama de dispersão unidimensional do índice de rugosidade Rq (μm) segundo índice qualitativo de rugosidade da microscopia eletrônica de varredura.



Legenda: Rq – Rugosidade média quadrática; MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura; μm – micrômetro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Os transplantes endoteliais evoluíram bastante nos últimos anos. Apesar disso, diversos questionamentos permanecem: qual técnica cirúrgica possibilita melhor resultado visual final? Quanto mais fino o enxerto melhor o resultado? Por que um transplante endotelial transparente e bem posicionado em determinadas situações pode se associar com déficit visual? Os resultados desta tese fornecem subsídios para se esclarecer alguns desses pontos duvidosos, contribuindo na análise da rugosidade da superfície desses enxertos, que compõe a interface óptica.

É importante destacar que a acuidade visual não é a única variável mensurável implicada em baixa visual pós-transplante, estando relacionada principalmente com os erros refracionais. Portanto, apenas ela não é suficiente para propiciar qualidade visual. Alterações de sensibilidade ao contraste e glare podem ocorrer apesar de boa acuidade visual. O espalhamento (*scattering*) da luz pode se dever a imperfeições nos meios ópticos, levando a diminuição na sensibilidade ao contraste (VAN DER MEULEN, 2012).

Doenças oculares prévias ao transplante podem também explicar os resultados visuais insatisfatórios: *haze* corneano, glaucoma, doenças retinianas, etc. Entretanto, excluídas estas alterações, as explicações para baixa visual são mais complexas: indução de aberrações de alta ordem, não compensação de aberrações geradas pela porção anterior da córnea, enxertos espessos, superfícies rugosas, etc. (MUFTUOGLU *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2012).

Após a preparação dos enxertos corneanos pelas cinco técnicas, esses foram fixados em papel de nitrocelulose, com orifício central de 3 mm. Desse modo, garantiu-se que permaneceriam na posição adequada para análise. Os três milímetros centrais correspondem à área de grande interesse para acuidade visual final, evitando também análise em áreas periféricas onde pode ter ocorrido manipulação com o instrumental.

A primeira tentativa para reconstrução das imagens e obtenção de índices de rugosidade das córneas deste estudo foi realizada com a microscopia de força atômica (MFA). O motivo da escolha inicial por esta técnica é que ela fornece índices objetivos para comparação de superfícies. Entretanto, com as análises de estudo piloto verificou-se tempo prolongado de obtenção de imagens, dificuldade de operação no MFA e por fim, o mais desapontador, a análise em área de dimensões

restritas, como 10 x 10 micrômetros, provavelmente pouco representativa da amostra. Assim, optou-se pela escolha da microscopia de desfocalização, microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica para análise (LOMBARDO *et al.*, 2012; ZIEBARTH *et al.*, 2013).

A microscopia de desfocalização é uma técnica que permite a reconstrução de superfícies de dimensões mínimas, como por exemplo, a superfície de hemácias e macrófagos. A córnea comporta-se como um objeto de fase, portanto, é possível estudá-la por meio dessa técnica. Não foi objetivo deste estudo a realização de comparação subjetiva através da MD, porém nota-se que, em algumas imagens da técnica DMEK, são evidentemente mais lisas do que nas demais. Comparando-se as reconstruções das outras técnicas não se percebeu diferença importante. (Figuras 10 a 14). As imagens reconstruídas encontram-se na dimensão de 1000 x 1000 pixels, já que o Image J trabalha com tal medida. Objetiva-se através do Matlab reconstruir tais imagens em micrômetros. É importante frisar que estas diferenças no aspecto subjetivo não sofreram ação do processamento das amostras para análise através da microscopia eletrônica de varredura (AGERO *et al.*, 2003; AGERO *et al.*, 2004).

Durante o desenvolvimento da técnica de microscopia de desfocalização, para sua validação foi utilizada a microscopia de força atômica. Redes de difração que possuem perfil senoidal, com período e amplitudes conhecidos, foram reconstruídas por ambas as técnicas, apresentando concordância entre os resultados. As placas possuem superfície uniforme, facilitando a reconstrução independente do tamanho da área em análise. Assim sendo, a técnica mostrou-se reproduzível (ANDRADE, 2010).

Houve uma tentativa de elaboração de índices objetivos para diferenciação das técnicas, porém os mesmos não se mostraram satisfatórios comparando-se com as diferenças obtidas com as demais microscopias (Tabela 1 – $p=0,190$ e $p=0,089$ para os índices MD1 e MD2, respectivamente). O uso da perfilometria óptica foi útil em demonstrar diferenças entre as mesmas amostras, já sendo técnica amplamente utilizada e validada para estudo de rugosidade. Um número amostral maior poderia evidenciar as diferenças obtidas com as demais técnicas. O tamanho amostral mínimo para cada grupo, utilizando-se dos índices de rugosidade MD 1 e MD 2 seria de 10 córneas. Entretanto, a disponibilidade de amostras que respeitassem os

critérios de inclusão e os custos para processamento inviabilizou atingir esse número.

Os gráficos 1 e 2 da dispersão dos índices de rugosidade 1 e 2 mostram uma tendência dos resultados da técnica DMEK serem inferiores aos das demais técnicas, porém não foi obtida diferença estatisticamente significativa.

Outro ponto que pode explicar não ter sido encontrada diferença entre a técnica DMEK e as demais na MD foi a utilização do mesmo valor para o índice de refração tanto na técnica DMEK como naquelas com estroma residual (índice de refração da córnea 1,37). Não foi encontrado na literatura o índice de refração apenas do endotélio-Descemet, objetivo de pesquisas futuras. Outros métodos apenas para obterem-se valores de rugosidade estão sendo desenvolvidos, sem que seja necessário o conhecimento de tal índice (análise de espalhamento da luz).

Para desenvolvimento dos *softwares* para reconstrução e obtenção de índices de rugosidade das imagens, é necessária a aplicação de filtros no banco de dados, eliminando ruídos, que podem eventualmente mascarar resultados reais (ANDRADE, 2010). A MD permite a análise das amostras sem uso de fixadores, desidratação, passagem por ponto crítico e metalização. Além disso, possibilita análise em áreas maiores do que na MFA.

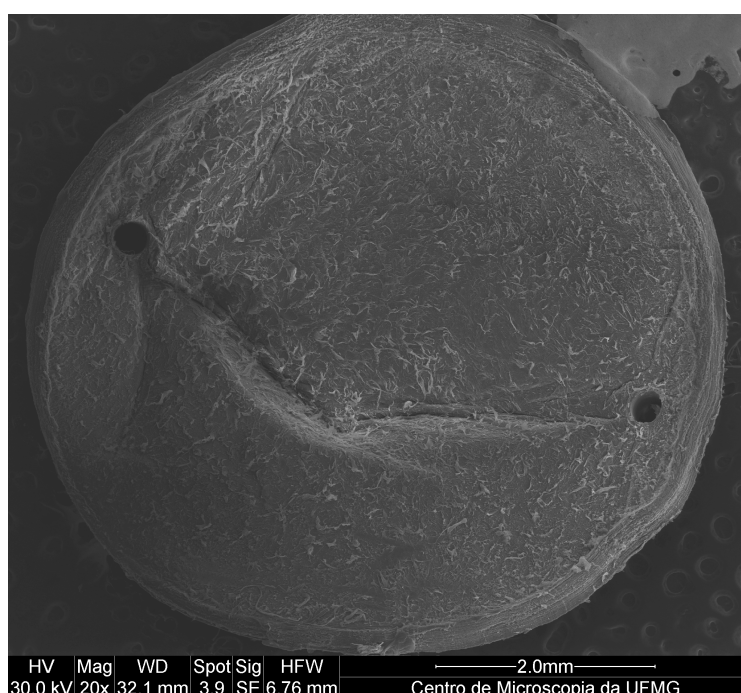
Os resultados obtidos com a técnica de microscopia de desfocalização não inviabilizam o seu uso para estudos de superfícies. Mais análises devem ser realizadas com esta técnica no intuito de refiná-la para mensuração de índices de rugosidade. Existe também a possibilidade dessa técnica ser utilizada para reconstrução e contagem do mosaico endotelial, à semelhança de um microscópio especular ou mesmo para análise do filme lacrimal.

O uso da microscopia eletrônica de varredura é técnica rotineira na análise de superfícies. Entretanto, é necessário preparo das amostras através dos processos de fixação primária, secundária, desidratação, passagem por ponto crítico e metalização, podendo haver alteração das propriedades das amostras. Para comparação destas, utiliza-se fundamentalmente de análise subjetiva, conforme as tabelas 3, 4 e 5. Diversos modelos foram criados na tentativa de otimizar a classificação subjetiva, muitos deles complexos, sem eliminar o viés de subjetividade (KUNERT *et al.*, 2011).

As análises tanto subjetiva como através de níveis de cinza foram realizadas com o mesmo aumento (350X). Em cada imagem o símbolo HFW (*Horizontal Field*

Width) corresponde ao tamanho da área analisada, que no caso de todas as imagens nesse tipo de microscopia foi de 0,39 x 0,39 milímetros. Para que durante o processo de preparação das amostras não ocorresse mudança da face a ser analisada decidiu-se fixar as mesmas com agulhas na periferia do enxerto. Porém, em um aumento menor (20x), observa-se que existe uma tensão sobre a amostra, que pode resultar em alterações na superfície, conforme mostra a Figura 8.

Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura realizada em amostra preparada através da técnica DSAEK 2.



Legenda: DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplast*; HV – High Voltage; Mag – Magnification Spot – mira; SE – Secondary Electron; HFW – Horizontal Field Width.

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Na análise subjetiva e objetiva da MEV, bem como na perfilometria óptica foi encontrada diferença significativa entre as amostras do grupo DMEK em relação às amostras com estroma residual (DSAEK 1, DSAEK 2, DSEK 1 e DSEK 2) (Tabelas 3 e 5). Claramente, nota-se que as amostras preparadas com a técnica DMEK são bem mais lisas que as demais, o que pode explicar a melhor performance visual obtida com essa técnica (HAM *et al.*, 2010). É interessante notar a presença de pontos sobre a superfície de alguma das amostras da técnica DMEK (Figura 15), que podem relacionar-se a projeções de fibras de colágeno estromais e material de matriz interfacial, podendo ter variações individuais. Tal fato pode fazer com que a

membrana de Descemet seja mais aderente ao estroma profundo, tornando o plano de clivagem mais resistente ao descolamento tanto através de forças mecânicas (*peeling*) quanto através de bolha de ar. (SCHLÖTZER-SCHREHARDT *et al.*, 2011; FENG; PRICE; PRICE JR., 2013). O estudo desta região da córnea torna-se importante não apenas para os transplantes endoteliais, como também para os transplantes lamelares anteriores profundos (DALK), na medida em que o plano de clivagem nessa técnica ocorre também entre Descemet e estroma posterior. Foi a partir de estudos realizados por meio do DALK que se reconheceu a camada de Dua, indicando que ainda há lacunas no conhecimento da histologia da córnea (DUA *et al.*, 2013).

A existência de um plano de clivagem entre a Descemet e o estroma corneano possibilita a obtenção de uma superfície mais lisa e homogênea na técnica DMEK. O mesmo não ocorre na dissecação do estroma, apesar da utilização do microcerátomo. Ou seja, não seria possível a manutenção de um plano de clivagem interlamelar durante a realização do corte. Teoricamente, com a técnica manual (DSEK) tal manutenção da dissecação em um único espaço interlamelar poderia ser possível.

O resultado da comparação entre as técnicas DSEK, DSAEK e suas variações foi surpreendente, pois não houve diferença estatística no índice subjetivo da MEV e nos índices de rugosidade da perfilometria (Tabelas 4 e 6) (PRICE; PRICE JR., 2006). Nenhum estudo havia realizado comparações microscópicas entre as duas técnicas. Essa semelhança pode refletir-se na obtenção de acuidade visual também semelhante. Price não encontrou diferença nos resultados visuais em 3, 6 e 12 meses de seguimento entre pacientes submetidos à DSEK e DSAEK (PRICE; PRICE JR., 2006). A ocorrência de remodelamento estromal pode explicar esta ausência de diferença no resultado visual final (VAN DER MEULEN *et al.*, 2012). Em estudo da Academia Americana de Oftalmologia não foram observadas diferenças explícitas na preparação dos tecidos através das técnicas DSEK e DSAEK (LEE *et al.*, 2009).

Foi utilizado no grupo DSAEK 1 microcerátomo desenvolvido nacionalmente e utilizado no Banco de Olhos de Minas Gerais – MG Transplantes. O corte foi realizado na profundidade de 400 micrômetros, pois esta era a única cabeça de microcerátomo disponível. Tal microcerátomo é automatizado e elétrico, diferente do Moria (DSAEK 2), em que a passagem do microcerátomo é manual e realizada

através de turbina (VICTOR *et al.*, 2006). Busin propôs a técnica de *double pass*, em que se realiza um corte com uma cabeça de 350 micrômetros e, em seguida, após medida paquimétrica é realizado um novo corte mais fino (110 micrômetros, por exemplo), o que teoricamente permitiria obter melhor acuidade visual (BUSIN; ALBÉ, 2014).

Utilizando-se do microcerátomo Moria, não foi observada diferença em relação aos cortes realizados com microcerátomo nacional (Tabela 4). Este resultado torna-se importante, pois o desenvolvimento de equipamento nacional permite a comercialização do mesmo a preços mais acessíveis, tanto do microcerátomo como dos insumos (lâminas). Além disso, o microcerátomo MASYK possibilita um corte automatizado e com controle contínuo do nível pressórico na câmara artificial. Mais estudos devem ser realizados, com maior número de amostras para confirmação dos resultados aqui obtidos. Existe limitação neste estudo com relação à oferta de córneas que respeitassem os critérios de inclusão, além dos custos com lâminas e processo de preparação de amostras (VICTOR *et al.*, 2006; VICTOR; ALVES; NOSÉ, 2006).

Em relação às técnicas com dissecação manual (DSEK 1 e DSEK 2) não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre ambas para a classificação subjetiva da MEV e índices de rugosidade da PO (Tabelas 4 e 6). A técnica inicial descrita por Price para o DSEK considera que a dissecação com as espátulas deve ser realizada o mais profundo possível, o que acarreta invariavelmente em um número maior de perfurações e perda de tecidos, impondo problema para um estudo com limitado número de amostras (PRICE; PRICE JR., 2006). Para minimizar essas perdas, decidiu-se realizar paquimetria para facilitar o início das dissecações. Talvez as dissecações pudessem ser mais profundas se a paquimetria houvesse sido realizada no local da incisão ao invés de central. Interessante notar que em algumas imagens da MEV na técnica DSEK 2 o aspecto mais rugoso pela análise subjetiva provavelmente se associa ao fato de que as lamelas de colágeno são mais frouxas profundamente, permitindo maior mobilidade da mesma, denotando aspecto mais rugoso (KAUFMAN *et al.*, 2011). Ou seja, a menos que houvesse uma proximidade maior com a camada de Dua ou a Descemet, o aspecto do estroma não seria tão liso como se especula em dissecações profundas (PHILLIPS *et al.*, 2013). Nota-se, em algumas imagens de dissecação mais superficial (Figura 18 – 70% da paquimetria

central), que o aspecto da superfície na técnica DSEK 1 é aparentemente mais liso, com fibras de colágeno entrelaçando-se.

Haveria a possibilidade da análise das amostras na MEV através do modo ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscopy*), em que não há necessidade do preparo (fixação, desidratação e metalização) (ZIEBARTH *et al.*, 2014). Tal fato minimiza artefatos e alteração do tecido com o processamento. Durante o processo de desidratação as amostras podem encolher até 60% e esta contração pode resultar em fragmentação do tecido. A análise pelo modo ESEM, entretanto, leva ao desgaste da amostra após sua leitura, inviabilizando o uso em outras sessões (ZIEBARTH *et al.*, 2013). Este tipo de análise ainda não é realizada no Centro de Microscopia da UFMG

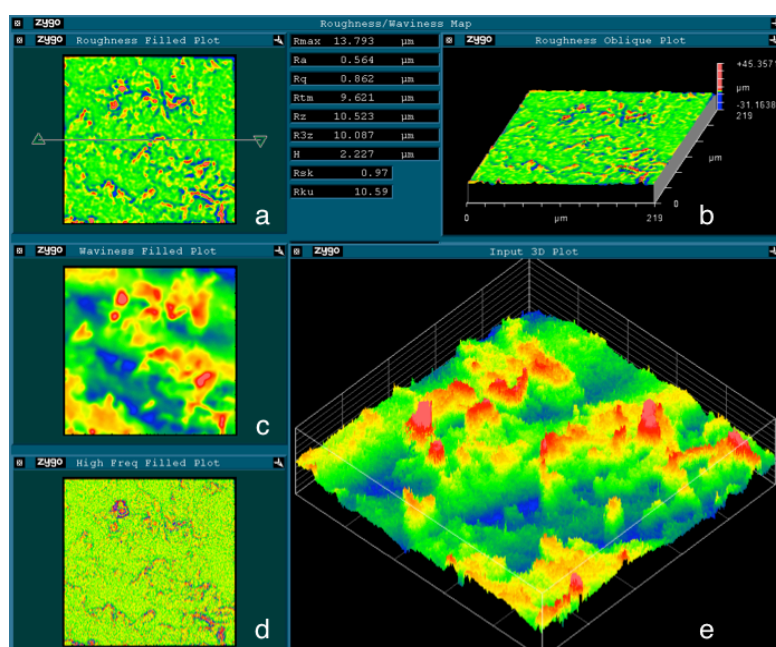
O uso de índices baseados em níveis de cinza das imagens de microscopia eletrônica de varredura está sujeita a erro, pois a análise ocorre em apenas duas dimensões, havendo uma extrapolação para a dimensão altura (SARAYBA *et al.*, 2007). Pode-se tentar obter imagens de altura fazendo-se angulações mínimas da amostra (MARIAN *et al.*, 2013). Não existe correlação real entre diferenças de nível de cinza e altura em micrômetros. Apesar de estudos realizarem esse tipo de análise quantitativa à MEV, não alertam sobre a possibilidade de erros (SARAYBA *et al.*, 2007).

Através da análise por nível de cinza foi observado que a técnica DMEK era também mais lisa que as demais, com exceção da técnica DSAEK 2 (Tabela 6). Isso não foi verificado na análise subjetiva nem na perfilometria óptica. Outro resultado discrepante em relação as demais técnicas foi a diferença observada entre a técnica DSAEK 2 e DSEK 1, em que a primeira técnica mostrou-se mais lisa por esta análise. Tais diferenças podem ter ocorrido pela não correlação real entre nível de cinza e altura como explicado anteriormente (SARAYBA *et al.*, 2007).

A perfilometria óptica é uma técnica pouco utilizada em oftalmologia. Apenas um estudo explora essa técnica para análise do desempenho de *excimer laser* (SHIMMICK *et al.*, 1997). A maior vantagem são as reconstruções obtidas e os índices de rugosidade fornecidos pelo aparelho, permitindo comparar de maneira mais fidedigna os espécimes. Pode-se observar pela figura abaixo (Figura 9) que a perfilometria óptica pode compor diversas perspectivas: *roughness filled plot* (gráfico de rugosidade – a e b), *waviness filled Plot* (gráfico de ondulações – c), *high freq filled Plot* (gráfico de alta frequência – d) e *input 3D plot* (gráfico 3D – e). O primeiro

quadro (a) representa a rugosidade da superfície, assim como o segundo (b). A diferença entre os dois é que o segundo tem uma representação oblíqua. Elas representam ondas de média frequência. O terceiro mapa (c) representa as ondas de baixa frequência (ondulações), enquanto o quarto mapa (d) as ondas de alta frequência que correspondem aos ruídos. Por fim, o mapa input 3D (e) é um somatório dos três tipos de frequência, obtendo assim a reconstrução da imagem. Nesta tela também estão disponíveis os índices de rugosidade: Ra, Rq, RMax, Skewness, Kurtosis, etc. (GROOT, 1993).

Figura 9: Perfilometria óptica realizada em amostra da técnica DSAEK 2.



Legenda: DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty* aumento de 50x (área analisada de 220 x 220 micrômetros) a e b – ondas de média frequência; c – ondas de baixa frequência; d – ondas de alta frequência; e – somatória das imagens.

Fonte: Acervo pessoal do autor.

O índice Ra corresponde a rugosidade média e o Rq a rugosidade quadrática média. São índices semelhantes, sendo que a rugosidade quadrática média pode facilitar a evidenciação de diferenças, devido ao maior valor obtido quando do seu cálculo. Vale ressaltar que estes índices analisam toda a área em estudo, não apenas uma linha. Assim, é importante que, para comparações, as áreas sejam as mesmas. Neste estudo a área foi de 0,22 x 0,22 mm. Idealmente, esta área poderia ser maior, o que facilitaria a comparação com as demais técnicas. Entretanto, devido

à convexidade da amostra, uma área maior prejudicava a captura das imagens (ZYGO CORPORATION, 2011).

Novas medidas no perfilômetro óptico devem ser realizadas sem o preparo das amostras, ou seja, analisadas no próprio meio de conservação da córnea. Isso também teoricamente minimizaria alterações provocadas pelo processamento.

A concordância entre os observadores na análise subjetiva pela MEV foi realizada por meio do índice Kappa, mostrando boa correlação (Tabela 2 – índice Kappa variando entre 0,60-0,80). (PERERA; HENEGHAN; BADENOCH, 2010). Vale destacar que existem grupos bastante díspares na análise, o que provavelmente facilitou a classificação.

Para concordância entre as técnicas de análise, utilizou-se a perfilometria óptica como referência. Houve correlação crescente com os índices da microscopia de desfocalização (Gráficos 6 e 7: $s=0,511$ e $s=0,620$ para o índice de rugosidade 1 e 2 da MD). Este é mais um dado que demonstra que o pequeno número de amostras pode, para o caso da técnica de microscopia de desfocalização, não ter sido suficiente para demonstrar as diferenças. A mesma correlação crescente (Gráfico 8: $s=0,501$) foi obtida com o índice objetivo de rugosidade da MEV.

Foi identificada também correlação entre o índice Rq e a classificação subjetiva pela MEV. Para as amostras classificadas subjetivamente como lisas, houve diferença entre o índice Rq para as demais classes (Tabela 7 e gráfico 9). Entretanto, o mesmo não ocorreu nas demais classificações (rugoso e intermediário), em que, apesar da diferença de classes, o valor de Rq não mostrou diferença significativa ($p=0,924$). Este é mais um dado que reforça a importância dos índices objetivos nas classificações das superfícies, pois amostras classificadas subjetivamente como diferentes em uma análise objetiva mostraram-se iguais.

Os critérios de inclusão e exclusão das amostras utilizadas nesse estudo foram de fundamental importância para garantir a qualidade dos tecidos utilizados, minimizando a obtenção de resultados discrepantes em função das amostras. Por isso, a utilização de córneas que, se não possuísem sorologias positivas, seriam normalmente transplantadas clinicamente (SANKA; LOFT; RANDLEMAN, 2010). Córneas de outras espécies apresentam organização histológica diferente da humana. Nas suínas, por exemplo, a ausência da Bowman deixa as lamelas com maior compressibilidade e elasticidade, gerando um aspecto mais liso do que a superfície estromal da córnea humana (SANKA; LOFT; RANDLEMAN, 2010).

As limitações desse estudo relacionam-se com o tamanho amostral limitado, devido à dificuldade técnica na obtenção e preparo das amostras. Idealmente, as medidas efetuadas através dos três tipos de microscopia deveriam ter sido realizadas exatamente no mesmo ponto. Tentou-se limitar tal viés, restringindo-se a área em análise aos três milímetros centrais. A tentativa de realizar marcações centrais na técnica DMEK poderia levar a danos na amostras (realização de furo central, por exemplo), inviabilizando a análise. Outro ponto seria a obtenção de mais medidas para uma mesma amostra. Porém, em estudo piloto verificou-se que para a técnica de microscopia de desfocalização e perfilometria óptica os índices de rugosidade eram semelhantes ao analisarem-se áreas diferentes dentro dos três milímetros centrais. Assim, decidiu-se manter apenas uma medida. Além disso, a demora para captura de mais imagens poderia causar danos na amostra. Ainda assim, a captura das imagens era realizada em três aumentos, sendo a córnea mantida em meio de preservação Optisol.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura é consagrada para análise de superfícies. Este trabalho não desqualifica a utilização de tal instrumento. Porém, diferenças entre as superfícies dos enxertos corneanos lamelares podem ser mínimas e de difícil determinação à análise subjetiva. Esse fato já foi observado com superfícies tratadas com laser de femtosegundo (KUNERT *et al.*, 2011). A análise através da MEV no modo ESEM e aquisições em modo tridimensional seriam ideais, porém não são realizados no centro de microscopia da UFMG. Com estas medidas evitar-se-ia comprometimento das amostras pelo processo de preparação, com maior fidelidade na análise de diferenças topográficas em uma determinada amostra (ZIEBARTH *et al.*, 2013).

A qualidade óptica da superfície dos enxertos é uma das variáveis que influencia o resultado visual final de um transplante. Desse modo, é importante o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a mensuração dessa rugosidade, fornecendo índices que permitam comparações mesmo discretas (ZIEBARTH *et al.*, 2013).

Quando são comparados grupos com características bem distintas como os grupos DMEK e DSEK / DSAEK a diferenciação tornou-se mais simples. Entretanto, quando a comparação ocorreu entre grupos semelhantes (DSEK / DSAEK e suas variações) a obtenção de índices objetivos fez-se necessária. Daí a necessidade do

desenvolvimento de técnicas para esta finalidade, como é o caso da microscopia de desfocalização.

É de fundamental importância destacar que a análise aqui realizada trata apenas de uma das variáveis possivelmente envolvidas no resultado visual final pós-transplante endotelial: a rugosidade. Ocorre que existe um processo de remodelamento do estroma corneano com o passar dos meses, de tal forma que amostras com rugosidade inicial mais elevada podem evoluir com resultado visual satisfatório. Isso pode explicar o porque da recuperação visual inicial de alguns pacientes ser mais rápida do que em outros (YAMAGUCHI *et al.*, 2009). O *haze* corneano observado na interface do transplantes endoteliais diminui com o tempo e deixa partículas altamente reflectivas de vários tamanhos. Geralmente, associam-se ao processo de cicatrização e tendem a desaparecer após seis meses, relacionando-se com debris celulares e ceratócitos degenerados, o que não ocorre na técnica DMEK (CHEN *et al.*, 2012).

A relevância desta tese encontra-se também na validação de mecanismos de mensuração de rugosidade de superfícies que possam ser aplicáveis nas áreas de cirurgia refrativa e transplante de córnea. Na avaliação do desempenho do excimer laser e do laser de femtosegundo as tecnologias utilizadas neste trabalho podem ser de extremo valor, facilitando comparações (RIAU *et al.*, 2014).

A qualidade óptica do olho humano é afetada pelos processos de reflexão, espalhamento da luz (*scattering*), difração e aberração. Os resultados dos estudos são conflitantes sobre qual dessas variáveis influenciaria mais negativamente os transplantes endoteliais: espalhamento de luz ou aberrações. O *scattering* da luz ocorre quando as irregularidades presentes em uma superfície são da ordem de grandeza do comprimento de onda da luz incidente. Quanto menor a irregularidade em relação ao comprimento de onda da luz, menor será o espalhamento da luz, com conseqüente menor influência sobre a qualidade visual. Tal diferença é o que parece ocorrer entre a técnica DMEK e as demais.

Interessante notar que os índices de rugosidade média obtidos com a perfilometria óptica na análise da técnica DMEK variaram entre 16 e 79 nanômetros, bem aquém do comprimento de onda da luz visível (370 a 750 nanômetros). Deste modo, durante a passagem da luz visível pela interface receptor-doador na técnica DMEK, a rugosidade teria menor influência, já que o comprimento de onda da luz visível está compreendido entre 370 e 750 nanômetros. Isso já não se mantém com

as demais técnicas de preparo do enxerto, em que a rugosidade média pode estar compreendida na faixa do comprimento da luz visível, podendo resultar em maior influência do fenômeno de espalhamento (*scattering*) e baixa acuidade visual, mesmo em um transplante anatomicamente bem sucedido. Entretanto, também algumas amostras com estroma residual mostraram resultados fora desse espectro, o que pode explicar resultados visuais satisfatórios mesmo com as técnicas DSEK ou DSAEK.

Outras irregularidades da superfície refrativa causam um aumento das aberrações de alta ordem e déficit na qualidade visual (YAMAGUCHI *et al.*, 2009; CHAMBERLAIN *et al.*, 2012; MCLAREN; PATEL, 2012). Para que tais alterações aconteçam, as amplitudes das irregularidades são da ordem de grandeza maior do que o comprimento de onda da luz incidente. Ou seja, as diferenças de rugosidade não explicariam o surgimento das aberrações ópticas. As explicações para o surgimento destas aberrações seriam: diferenças ceratométricas entre doador e receptor, não-alinhamento das lamelas por descentração do enxerto, cicatrização e contração estromal, trepanações assimétricas, etc. Apesar da indução de aberração de alta ordem na face posterior da córnea, a diferença nos índices de refração na superfície anterior é 10 vezes maior que aquela da superfície posterior. Assim, espera-se que a contribuição da superfície posterior para as aberrações corneanas seja menor (MUFTUOGLU *et al.*, 2010).

A indução de aberrações de alta ordem pela superfície posterior dos enxertos corneanos, entretanto, não deve ser ignorada. Em pacientes submetidos a transplante penetrante e DALK a indução de aberrações de alta ordem tanto na superfície anterior como na posterior é semelhante. A técnica DSAEK relacionou-se com menor indução de aberrações de alta ordem na superfície anterior do que as outras duas técnicas anteriores, porém ainda maior do que em um grupo controle formado por indivíduos com ausência de alteração corneana (TERRY *et al.*, 2012). Quando é analisada a indução de aberrações na superfície posterior existem dados conflitantes entre os estudos sobre a presença ou não de diferença entre DSAEK, DALK e transplante penetrante. Quando a diferença existe, a indução de aberrações na superfície posterior é maior na técnica DSAEK (MUFTUOGLU *et al.*, 2010; KOH *et al.*, 2012). Tal aumento pode ser explicado pela perda do paralelismo entre as superfícies anterior e posterior (que ocorre nas demais técnicas), gerando uma

indução de 20% de aberrações se comparado com a superfície anterior (YAMAGUCHI *et al.*, 2011).

O maior grau de irregularidade encontrado nas técnicas com estroma residual somente será fonte de indução de aberrações de alta ordem se estas irregularidades forem transferidas para superfície interna (face endotelial), já que é nesta interface que ocorre diferença entre os índices de refração córnea (1,376) e humor aquoso (1,336) (CHAMBERLAIN *et al.*, 2012). Um conceito importante é que a aberração total da córnea não deve ser avaliada como um somatório simples das aberrações geradas na porção anterior e posterior da córnea. A explicação para tal fato é que descentrações entre as superfícies podem causar outras aberrações, os raios de luz não são mais paralelos ao atingir a superfície posterior e a espessura corneana também tem influência nesse cálculo (YAMAGUCHI *et al.*, 2011).

As opacidades de interface podem estar presentes devido à fibrose subepitelial pelo edema epitelial crônico em decorrência da doença endotelial (distrofia endotelial de Fuchs ou ceratopatia bolhosa pseudofácica) ou pela interação entre as interfaces estromais doador-receptor (PANTANELLI *et al.*, 2012). No caso da técnica DMEK, esta interface pode estar presente somente por conta do edema crônico. Como observado nas técnicas de microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica, as superfícies dos transplantes preparados através da técnica DMEK apresentavam-se sempre mais lisas do que nas demais técnicas, sendo, portanto um ponto-chave para melhor interface. Entretanto, apesar da evidência clara dessa melhor interface e consequente melhor qualidade visual, esta técnica ainda não é amplamente realizada por contado preparo e inserção possuem longa curva de aprendizado, os mecanismos de adesão do enxerto ainda não serem completamente esclarecidos e a perda endotelial inicial ainda ser um problema (MUFTUOGLU *et al.*, 2010). Além disso, as técnicas com estroma residual podem ser a primeira escolha em pacientes com câmara anterior muito profunda, cirurgias fistulantes, grandes defeitos irianos e pacientes que não podem realizar visitas pós-operatórias mais frequentes (GUERRA *et al.*, 2011).

Uma das grandes vantagens dos transplantes endoteliais é a possibilidade de realizar um novo transplante em caso de resultados visuais insatisfatórios, sem que isso signifique piora no prognóstico visual. Diversos casos já foram relatados de substituição de enxertos realizados com as técnicas DSEK/DSEK por DMEK, com melhora na acuidade visual. Entretanto, tal situação levanta questões éticas sobre a

realização de um segundo transplante após sucesso parcial do primeiro. Pacientes poderiam ser submetidos à DSEK / DSAEK em casos em que a transparência corneana inicial fosse inviável para DMEK. Em seguida, após recuperação inicial, seria realizado novo transplante (DMEK). A grande questão é saber qual resultado deve ser considerado insatisfatório para partir-se para um segundo procedimento. Quais parâmetros visuais utilizar para esta decisão? Seria ético privar o paciente de um resultado visual melhor, mesmo que para isso sejam descartados tecidos com relativo sucesso visual? (HAM *et al.*, 2010; GUERRA *et al.*, 2011). A legislação e a logística dos bancos de olhos necessitam adequar-se a estes questionamentos.

Desse modo, este estudo teve como foco uma das variáveis que influencia o resultado final de um transplante endotelial: a rugosidade. Outras variáveis como perda endotelial, medidas paquimétricas, relação entre espessura central e periférica do enxerto e dificuldade no preparo também devem ainda ser consideradas na comparação das técnicas.

7 CONCLUSÃO

A microscopia de desfocalização, a microscopia eletrônica de varredura e a perfilometria óptica se revelaram como ferramentas úteis na análise das superfícies de enxertos corneanos preparados para transplante endotelial, apesar de a desfocalização não ter mostrado diferença significativa entre os grupos.

Os enxertos preparados pela técnica DMEK apresentaram menor rugosidade, à avaliação qualitativa e quantitativa pela MEV, e à avaliação quantitativa pela perfilometria óptica. Esse aspecto pode explicar, pelo menos em parte, os melhores resultados visuais da técnica DMEK obtidos na prática clínica. Em relação às técnicas com estroma residual, DSEK e DSAEK, não houve diferença significativa entre os índices de rugosidade à perfilometria óptica e à análise qualitativa pela microscopia eletrônica de varredura, apesar do uso de diferentes microcerátomos e profundidades de dissecação manual, o que também pode ser uma das explicações para os resultados visuais semelhantes na experiência clínica.

Por fim, houve correlação de concordância do índice de rugosidade média quadrática (R_q) com os demais índices obtidos nas técnicas de microscopia de desfocalização e microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, não houve concordância com a avaliação qualitativa à MEV, sugerindo a superioridade da quantificação da rugosidade dessas superfícies sobre a avaliação subjetiva.

REFERÊNCIAS

AGERO, Ubirajara; MONKEN, C. H.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, Ricardo Tostes; MESQUITA, Oscar Nassif de. *Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy*. **Physical Review**, v. 67, n. 5, Pt1, 2003.

AGERO, Ubirajara; MESQUITA, L. G.; NEVES, B. R. A.; GAZZINELLI, Ricardo Tostes; MESQUITA, Oscar Nassif de. Defocusing microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 65, n. 3, p.159-165, 2004.

ALMEIDA, Hirlana Gomes; SOUZA, Ana Catarina Delgado de. Perfil epidemiológico de pacientes na fila de transplante de córnea no Estado de Pernambuco – Brasil. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 73, n. 1, p.28-32, 2014.

ANDRADE, Ulisses Moreia Silveira. **Microscopia de desfocalização e seus limites de validade: Um estudo experimental**. Dissertação [Mestrado em Física]. 69f. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2010.

ANSHU, Arundhati; PRICE, Marianne O.; TAN, Donald T. H.; PRICE JR., Francis W. *Endothelial keratoplasty: a revolution in evolution*. **Survey of Ophthalmology**, v. 57, n. 3, p.236-252, 2012.

ANWAR, Hamed M.; DANASOURY, El A. M.; HASHEM, A. N. *Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty for congenital hereditary endothelial dystrophy*. **Clinical Ophthalmology**, n. 6, p.159-163, 2012.

ARMOUR, Rebecca L.; OUSLEY, Paula J.; WALL, Jennifer; HOAR, Karen; STOEGER, Chris; TERRY, Mark A. *Endothelial keratoplasty using donor tissue not suitable for full-thickness penetrating keratoplasty*. **Cornea**, v. 26, n. 5, p.515-519, 2007.

BAHAR, Irit; KAISERMAN, Igor; SANSANAYUDH, Wiwan; LEVINGER, Eliya; ROOTMAN, David S. *Busin guide vs forceps for the insertion of the donor lenticule in Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*. **American Journal of Ophthalmology**, v. 147, n. 2, p.220-226, 2009.

BANITT, Michael R.; CHOPRA, Vikas. *Descemet's stripping with automated endothelial keratoplasty and glaucoma*. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 21, n. 2, p.144-149, 2010.

BIALER, Omer; BAHAR, Irit. *Anterior chamber air-fluid exchange for graft adhesion during Descemet stripping automated endothelial keratoplasty surgery*. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 46, n. 4, p.358-359, 2011.

BONFADINI, Gustavo; LADAS, John G.; MOREIRA, Hamilton; CAMPOS, Mauro; MATTHAEI, Mario; MUÑOZ, Beatriz *et al*. *Optimization of intraocular lens constant improves refractive outcomes in combined endothelial keratoplasty and cataract surgery*. **Ophthalmology**, v. 120, n. 2, p.234-239, 2013.

BUSIN, Massimo; ALBÉ, Elena. *Does thickness matter: ultrathin Descemet stripping automated endothelial keratoplasty*. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 25, n. 4, p.312-318, 2014.

BUSIN, Massimo; BELTZ, Jacqueline; SCORCIA, Vincenzo. *Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty for congenital hereditary endothelial dystrophy*. **Archives of Ophthalmology**, v. 129, n. 9, p.1140-1146, 2011.

BUSIN, Massimo; MADI, Silvana; SANTORUM, Paolo; SCORCIA, Vincenzo; BELTZ, Jacqueline. *Ultrathin descemet's stripping automated endothelial keratoplasty with the microkeratome double-pass technique: two-year outcomes*. **Ophthalmology**, v. 120, n. 6, p.1186-1194, 2013.

CHAMBERLAIN, Winston; OMID, Nika; LIN, Amy; FARID, Marjan; GASTER, Ronald N.; STEINERT, Roger F. *Comparison of corneal surface higher-order aberrations after endothelial keratoplasty, femtosecond laser-assisted keratoplasty, and conventional penetrating keratoplasty*. **Cornea**, v. 31, n. 1, p.6-13, 2012.

CHEN, Minjie; GONG, Lan; XU, Jianjiang; ZHU, Wenqing; DEVINE, Erin E. *Ultrastructural and in vivo confocal microscopic evaluation of interface after Descemet's Stripping Endothelial Keratoplasty in rabbits*. **Acta Ophthalmologica**, v. 90, n. 1, p.43-47, 2012.

COELHO NETO, José; AGERO, Ubirajara; GAZZINELLI, Ricardo Tostes; MESQUITA, Oscar Nassif de. *Measuring optical and mechanical properties of a living cell with defocusing microscopy*. **Biophysical Journal**, v. 91, n. 3, p.1108-1115, 2006.

COSTA, Rodolfo Felipe de Oliveira. **Estudo da rugosidade do Plano (100) do silício monocristalino submetido à corrosão anisotrópica em KOH**. Monografia [Pós-graduação em Física]. 55f. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2008.

COVERT, Douglas J.; KOENIG, Steven B. *Descemet stripping and automated endothelial keratoplasty (DSAEK) in eyes with failed penetrating keratoplasty*. **Cornea**, v. 26, n. 6, p.692-696, 2007.

DAPENA, Isabel; HAM, Lisanne; MELLES, Gerrit. *Endothelial keratoplasty: DSEK/DSAEK or DMEK – the thinner the better?* **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 20, n. 4, p.299-307, 2009.

DIRISAMER, Martin; DAPENA, Isabel; VAN DJIK, Korine; MELLES, Gerrit R. J. *Descemet membrane endothelial transfer: “free-floating” donor Descemet implantation as a potential alternative to “keratoplasty”*. **Cornea**, v. 31, n. 2, p.194-197, 2012a.

DIRISAMER, Martin; YEH, Ru-Yin; VAN DJIK, Korine; HAM, Lisanne; DAPENA, Isabel; MELLES, Gerrit R. J. *Recipient endothelium may relate to corneal clearance in descemet membrane endothelial transfer*. **American Journal of Ophthalmology**, v. 154, n. 2, p.290-296, 2012b.

DIRISAMER, Martin; PARKER, Jack; NAVEIRAS, Miguel; LIARAKOS, Vasilios S.; HAM, Lianne; VAN DJIK, Korine; MELLES, Gerrit R. J. *Identifying causes for poor visual outcome after DSEK/DSAEK following secondary DMEK in the same eye. **Acta Ophthalmologica***, v. 91, n. 2, p.131-139, 2013.

DUA, Harminder S.; FARAJ, Lana A.; SAID, Dalia G.; GRAY, Trevos; LOWE, James. *Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). **Ophthalmology***, v. 120, n. 9, p.1778-1785, 2013.

EGUCHI, Hiroshi; MIYAMOTO, Tatsuro; HOTTA, Fumika; TOMIDA, Machiko; INOUE, Masayuki; MITAMURA, Yoshinori. *Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty for vitrectomized cases with traumatic aniridia and aphakic bullous keratopathy. **Clinical Ophthalmology***, n. 6, p.1513-1518, 2012.

FENG, Matthew T.; PRICE, Marianne O.; PRICE JR., Francis W. *Update on Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). **International Ophthalmology Clinics***, v. 53, n. 2, p.31-45, 2013.

GANGWANI, Vinod; OBI, Adanna; HOLLICK, Emma J. *A prospective study comparing EndoGlide and Busin glide insertion techniques in descemet stripping endothelial keratoplasty. **American Journal of Ophthalmology***, v. 153, n. 1, p.38-43, 2012.

GOMES, Livia Siman. **Desenvolvimento de métodos em microscopia óptica para obtenção de parâmetros biomecânicos de células e moléculas únicas**. Tese [Doutorado em Ciências – Física]. 174f. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2013.

GRAUE-HERNANDEZ, Enrique O.; ZUNIGA-GONZALEZ, Isaac; HERNANDEZ-CAMARENA, Julio C.; JAIMES, Martha; CHIRINOS-SALDANA, Patricia; NAVAS, Alejandro; RAMIREZ-MIRANDA, Arturo. *Tectonic DSAEK for the Management of Impending Corneal Perforation. **Case Reports in Ophthalmological Medicine***, n. 916528, 2012.

GROOT, Peter de. **What is frequency domain analysis**. Middlefield: Zygo Corporation, 1993.

GROOT, Peter de. *Phase shifting interferometry*. In: ZYGO CORPORATION. **Optical measurement of surface topography**. Middlefield: Zygo Corporation, 2011, p.167-186.

GROTTONE, Gustavo Teixeira; PEREIRA, Nicolas Cesário; GOMES, José Álvaro Pereira. *Endothelial keratoplasty: evolution and horizons. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia***, v. 75, n. 6, p.439-446, 2012.

GUERRA, Frederico; ANSHU, Arundhati; PRICE, Marianne; PRICE, Francis. *Endothelial keratoplasty: fellow eyes comparison of Descemet stripping automated endothelial keratoplasty and Descemet membrane endothelial keratoplasty. **Cornea***, v. 30, n. 12, p.1382-1386, 2011.

HAM, Lisanne; DAPENA, Isabel; VAN DER WEES, Jacqueline; MELLES, Gerrit. *Secondary DMEK for poor visual outcome after DSEK: donor posterior stroma may limit visual acuity in endothelial keratoplasty.* **Cornea**, v. 29, n. 11, p.1278-1283, 2010.

HASHEMI, Hassan; GHAFFARI, Reza; MOHEBI, Masomeh. *Posterior lamellar keratoplasty (DSAEK) in Peters anomaly.* **Cornea**, v. 31, n. 10, p.1201-1205, 2012.

HITANI, Kouichiro; YOKOO, Seiichi; HONDA, Norihiko; USUI, Tomohiko; YAMAGAMI, satoru; AMANO, Shiro. *Transplantation of a sheet of human corneal endothelial cell in a rabbit model.* **Molecular Vision**, n. 14, p.1-9, 2008.

HJORTDAL, Jesper; NIELSEN, Esben; VESTERGAARD, Anders; SONDERGAARD, Anders. *Inverse cutting of posterior lamellar corneal grafts by a femtosecond laser.* **The Open Ophthalmology Journal**, n. 6, p.19-22, 2012.

JOYCE, Nancy C. *Proliferative capacity of corneal endothelial cells.* **Experimental Eye Research**, v. 95, n. 1, p.16-23, 2012.

KAUFMAN, Paul L.; ALM, Albert; LEVIN, Leonard A.; NILSSON, Siv F. E.; VER HOEVE, James; WU, Samuel (orgs.). **Adler's physiology of the eye**. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.

KHOR, Wei-Boon; TEO, Kelvin Y.; MEHTA, Jodhbir S.; TAN, Donald T. *Descemet stripping automated endothelial keratoplasty in complex eyes: results with a donor insertion device.* **Cornea**, v. 32, n. 8, p.1063-1068, 2013.

KOH, Shizuka; MAEDA, Naoyuki; NAKAGAWA, Tomoya; NISHIDA, Kohji. *Quality of vision in eyes after selective lamellar keratoplasty.* **Cornea**, v. 31, sup. 1:S45-S49, 2012a.

KOH, Shizuka; MAEDA Naoyuki; NAKAGAWA, Tomoya; HIGASHIURA, Ritsuko; SAIKA, Makoto; MIHASHI, Toshifumi *et al.* *Characteristic higher-order aberrations of the anterior and posterior corneal surfaces in 3 corneal transplantation techniques.* **American Journal of Ophthalmology**, v. 153, n. 2, p.284-290, 2012b.

KOIZUMI, Noriko; OKUMURA, Naoki; UENO, Morio; KAKAGAWA, Hiroko; HAMURO, Junji; KINOSHITA, Shigeru. *Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy.* **Cornea**, v. 32, n. 8, p.1167-1170, 2013.

KUNERT, Kathleen S.; BLUM, Marcus; DUNCKER, Gernot I.; SIETMANN, Rabea; HEICHEL, Jens. *Surface quality of human corneal lenticules after femtosecond laser surgery for myopia comparing different laser parameters.* **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.249, n. 9, p.1417-1424, 2011.

LAASER, Kathrin; BACHMANN, Bjoern; HORN, Folkert K.; CURSIEFEN, Claus; KRUSE, Friedrich E. *Descemet membrane endothelial keratoplasty combined with phacoemulsification and intraocular lens implantation: advanced triple procedure.* **American Journal of Ophthalmology**, v. 154, n. 1, p.47-55, 2012.

LAI, Jui-Yang; CHEN, Ko-Hua; HSIUE, Ging-Ho. *Tissue-engineered human corneal endothelial cell sheet transplantation in a rabbit model using functional biomaterials. **Transplantation***, v. 84, n. 10, p.1222-1232, 2007.

LEE, W. Barry; JACOBS, Deborah S.; MUSCH, David C.; KAUFMAN, Stephen C.; REINHART William J.; SHTEIN, Roni M. *Descemet's stripping endothelial keratoplasty: safety and outcomes: a report by the American Academy of Ophthalmology. **Ophthalmology***, v. 116, n. 9, p.1818-1830, 2009.

LIARAKOS, Vasilios S.; DAPENA, Isabel; HAM, Lisanne; VAN DIJK, Korine; MELLES, Geritt R. J. *Intraocular graft unfolding techniques in descemet membrane endothelial keratoplasty. **JAMA Ophthalmology***, v. 131, n. 1, p.29-35, 2013.

LIM, Laurence S; AUNG, Han T.; AUNG, Tim; TAN, Donald T. H. *Corneal imaging with anterior segment optical coherence tomography for lamellar keratoplasty procedures. **American Journal of Ophthalmology***, v. 145, n. 1, p.81-90, 2008.

LOMBARDO, Marco; DESANTO, Maria; LOMBARDO, Giuseppe; LOMORIELLO, Domenico; DESIDERIO, Giovanni; DUCOLI, Pietro *et al. Surface quality of femtosecond dissected posterior human corneal stroma investigated with atomic force microscopy. **Cornea***, v. 31, n. 12, p.1369-1375, 2012.

MAIER, Anna-Karina; GUNDLACH, Enken; GONNERMANN, Johannes; KLAMANN, Matthias K.; EULUFI, Christian; BERTELMANN, Eckart *et al. Fellow eye comparison of Descemet membrane endothelial keratoplasty and penetrating keratoplasty. **Cornea***, v. 32, n. 10, p.1344-1348, 2013.

MARIAN, Anca; NADA Ossama; LÉGARÉ, François; MEUNIER, Jean; VIDAL, François; ROY, Sébastien *et al. Smoothness assessment of corneal stromal surfaces. **Journal of Cataract and Refractive Surgery***, v. 39, n. 1, p.118-127, 2013.

MCLAREN, Jay W.; PATEL, Sanjay V. *Modeling the effect of forward scatter and aberrations on visual acuity after endothelial keratoplasty. **Investigative Ophthalmology & Visual Science***, v. 53, n. 9, p.5545-5551, 2012.

MAU, Kathryn. *What DSAEK is going on? An alternative to penetrating keratoplasty for endothelial dysfunction. **Optometry***, v. 80, n. 9, p.513-523, 2009.

MCCAULEY, Matthew B.; PRICE JR., Francis W.; PRICE, Marianne O. *Descemet membrane automated endothelial keratoplasty: hybrid technique combining DSAEK stability with DMEK visual results. **Journal of Cataract and Refractive Surgery***, v. 35, n. 10, p.1659-1664, 2009.

MEHTA, Jodhbir S.; PARTHASARTHY, Anand; POR, Yong-Ming; CAJUCOM-UY, Howard; BEUERMAN, Roger W.; TAN, Donald. *Femtosecond laser-assisted endothelial keratoplasty: a laboratory model. **Cornea***, v. 27, n. 6, p.706-712, 2008.

MOREIRA, Breno Barbosa. **A transformada de Hough aplicada à difração de elétrons retroespalhados**. Monografia [Especialização em Matemática]. 71f. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2012.

MOSHIRFAR, Majid; KHALIFA, Yousuf M.; DAVIS, Don; FENZL, Carlton R.; ESPANDAR, Ladan; CHANG, Joann C. *et al.* *Descemet stripping automated endothelial keratoplasty using donor corneas with previous laser in situ keratomileusis or photorefractive keratectomy: a case series and donor cap histopathology.* **Cornea**, v. 31, n. 5, p.533-537, 2012.

MUFTUOGLU, Orkun; PRASHER, Pawan; BOWMAN, R. Wayne; MCCULLEY, James P.; MOOTHA, V. Vinod. *Corneal higher-order aberrations after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty.* **Ophthalmology**, v. 117, n. 5, p.878-884, 2010.

MURAINÉ, Marc; GUEUDRY, Julie; HE, Zhiguo; PISELLI, Simone; LEFEVRE, Sabine; TOUBEAU, David. *Novel technique for the preparation of corneal grafts for Descemet membrane endothelial keratoplasty.* **American Journal of Ophthalmology**, v. 156, n. 5, p.851-859, 2013.

OKUMURA, Naoki; KOIZUMI, Noriko; UENO, Morio; SAKAMOTO, Yuji; TAKAHASHI, Hiroaki; TSUCHIYA, Hideaki *et al.* *ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue.* **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 1, p.268-277, 2012.

PANTANELLI, Seth M.; SABESAN, Ramkumar; CHING, Steven S.; YOON, Geunyoung; HINDMAN, Holly B. *Visual performance with wave aberration correction after penetrating, deep anterior lamellar, or endothelial keratoplasty.* **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 8, p.4797-4804, 2012.

PATEL, Sanjay V.; BARATZ, Keith H.; MAGUIRE, Leo J.; HODGE, David O.; MCLAREN, Jay W. *Anterior corneal aberrations after Descemet's stripping endothelial keratoplasty for Fuchs' endothelial dystrophy.* **Ophthalmology**, v. 119, n. 8, p.1522-1529, 2012.

PERERA, Rafael; HENEGHAN, Carl; BADENOCH, Douglas. **Ferramentas estatísticas no contexto clínico.** Porto Alegre: Artmed; 2010.

PHILLIPS, Paul M.; PHILLIPS, Louis J.; SAAD, Hisham A.; TERRY, Mark A.; STOLZ, Donna B.; STOEGER, Christopher *et al.* *"Ultrathin" DSAEK tissue prepared with a low-pulse energy, high-frequency femtosecond laser.* **Cornea**, v. 32, n. 1, p.81-86, 2013.

PHILLIPS, Paul M.; TERRY, Mark A.; SHAMIE, Neda; CHEN, Edwin S.; HOAR, Karen L.; STOEGER, Chris *et al.* *Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) using corneal donor tissue not acceptable for use in penetrating keratoplasty as a result of anterior stromal scars, pterygia, and previous corneal refractive surgical procedures.* **Cornea**, v. 28, n. 8, p.871-876, 2009.

PRICE, Marianne O.; PRICE JR., Francis W. *Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue.* **Ophthalmology**, v. 113, n. 11, p.1936-1942, 2006.

PRICE, Marianne O.; PRICE JR., Francis W. *Endothelial keratoplasty: a review. Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 38, n. 2, p.128-140, 2010.

PRICE, Marianne O.; PRICE JR., Francis W.; TRESPALACIOS, Rafael. *Endothelial keratoplasty technique for aniridic aphakic eyes. Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v. 33, n. 3, p. 376-379, 2007.

RIAU, Andri K.; LIU, Yu-Chi; LWIN, Nyein C.; ANG, Heng P.; TAN, Neil Y.; YAM, Gary H. F. *et al. Comparative study of nJ- and muJ-energy level femtosecond lasers: evaluation of flap adhesion strength, stromal bed quality, and tissue responses. Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 55, n. 5, p.3186-3194, 2014.

ROSE, Linda; KELLIHER, Clare; JUN, Albert S. *Endothelial keratoplasty: historical perspectives, current techniques, future directions. Canadian Journal of Ophthalmology*, v. 44, n. 4, p.401-405, 2009.

SANKA, R. Krishna; LOFT, Evan S.; RANDLEMAN, J. Bradley. *Effect of varying microkeratome parameters on laser in situ keratomileusis interface surfaces. Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v. 36, n. 3, p.493-496, 2010.

SARAYBA, Melvin A.; IGNACIO, Teresa S.; BLINDER, Perry S.; TRAN, Dan B. *Comparative study of stromal bed quality by using mechanical, IntraLase femtosecond laser 15- and 30-kHz microkeratomes. Cornea*, v. 26, n. 4, p.446-451, 2007a.

SARAYBA, Melvin A.; IGNACIO, Teresa S.; TRAN, Dan B.; BLINDER, Perry S. *A 60 kHz IntraLase femtosecond laser creates a smoother LASIK stromal bed surface compared to a Zyoptix XP mechanical microkeratome in human donor eyes. Journal of Refractive Surgery*, v. 23, n. 4, p.331-337, 2007b.

SCHLÖTZER-SCHREHARDT, Ursula; BACHMANN, Bjoern O.; LAASER, Kathrin; CURSIEFEN, Claus; KRUSE, Friedrich E. *Characterization of the cleavage plane in DESCemet's membrane endothelial keratoplasty. Ophthalmology*, v. 118, n. 10, p.1950-1957, 2011.

SHIMMICK, John K.; TELFAIS, William B.; MUNNERLYN, Charles R.; BARTLETT, Jimmy D.; TROKEL, Stephen L. *Corneal ablation profilometry and steep central islands. Journal of Refractive Surgery*, v. 13, n. 3, p.235-245, 1997.

SHINTON, Anthony J.; TSATSOS, Michael; KONSTANTOPOULOS, Aris; GOVERDHAN, Srimi; ELSAHN, Ahmad F.; ANDERSON, David S.; HOSSAIN, Parwes. *Impact of graft thickness on visual acuity after Descemet's stripping endothelial keratoplasty. The British Journal of Ophthalmology*, v. 96, n. 2, p.246-249, 2012.

SOONG, Hunson Kaz; MALTA, João Baptista Nigro Santiago; MIAN, Shahzad Ihsan; JUHASZ, Tibor. *Femtosecond laser-assisted lamellar keratoplasty. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 71, n. 4, p.601-606, 2008.

STRAIKO, Michael D.; SHAMIE, Neda; TERRY, Mark A. *Endothelial keratoplasty: past, present, and future directions. **International Ophthalmology Clinics***, v. 50, n. 3, p.123-135, 2010.

STRAIKO, Michael D.; TERRY, Mark A.; SHAMIE, Neda. *Descemet stripping automated endothelial keratoplasty under failed penetrating keratoplasty: a surgical strategy to minimize complications. **American Journal of Ophthalmology***, v. 151, n. 2, p.233-237, 2011.

STUDENY, Pavel; FARKAS, Andrej; VOKROJOVA, Magdalena; LSKOVA, Petra; JIRSOVA, Katerina. *Descemet membrane endothelial keratoplasty with a stromal rim (DMEK-S). **The British Journal of Ophthalmology***, v. 94, n. 7, p.909-914, 2010.

STUDENY, Pavel; SIVEKOVA, Deli; LIEHNEOVA, Katerina; VOKROJOVA, Magdalena; KUCHYNKA, Pavel. *Hybrid technique of lamellar keratoplasty (DMEK-S). **Journal of Ophthalmology***, n. 254383, 2013.

TALAJIC, Julia C.; STRAIKO, Michael D.; TERRY, Mark A. *Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: then and now. **International Ophthalmology Clinics***, v. 53, n. 2, p.1-20, 2013.

TARAVELLA, Michael J.; SHAH, Vipul; DAVIDSON, Richard. *Ultrathin DSAEK. **International Ophthalmology Clinics***, v. 53, v. 2, p.21-30, 2013.

TERRY, Mark A. *Endothelial keratoplasty: why aren't we all doing Descemet membrane endothelial keratoplasty? **Cornea***, v. 31, n. 5, p.469-471, 2012.

TERRY, Mark A.; STRAIKO, Michael D.; GOSHE, Jeffrey M.; LI, Jennifer Y.; DAVIS-BOOZER, David. *Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: the tenuous relationship between donor thickness and postoperative vision. **Ophthalmology***, v. 119, n. 10, p.1988-1996, 2012.

TONG, C. Maya; MELLES, Gerrit. *Where is endothelial keratoplasty going: from Descemet stripping (automated) endothelial keratoplasty to Descemet membrane endothelial keratoplasty to Descemet membrane endothelial transfer? **Canadian Journal of Ophthalmology***, v. 47, n. 3, p.197-200, 2012.

TOURTAS, Theofilos; LASSER, Kathrin; BACHMANN, Bjoern O.; CURSIEFEN, Claus; KRUSE, Friedrich E. *Descemet membrane endothelial keratoplasty versus descemet stripping automated endothelial keratoplasty. **American Journal of Ophthalmology***, v. 153, n. 6, p.1082-1090, 2012.

VAN DER MEULEN, Ivanka J.; VAN RIET, Tom C.; LAPID-GORTZAK, Ruth; NIEUWENDAAL, Carla; VAN DER BERG, Thomas J. T. *Correlation of straylight and visual acuity in long-term follow-up of manual descemet stripping endothelial keratoplasty. **Cornea***, v. 31, n. 4, p.380-386, 2012.

VICTOR, Gustavo; FARIA E SOUSA, Sidney Julio; ALVES, Milton Ruiz; NOSÉ, Walton. *Malks: especificações e desenvolvimento. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia***. V. 69, n. 2, p.151-155, 2006.

VICTOR, Gustavo; ALVES, Milton Ruiz; NOSÉ, Walton. Avaliação da qualidade de corte do microcerátomo Masyk na confecção de lamela corneana pediculada em olhos humanos de Banco de Olhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.69, n. 4, p.561-564, 2006.

WHIKEHART, David R.; PARIKH, Chirag H.; VAUGHN, Alexia V.; MISHLER, Kathy; EDELHAUSER, Henry F. *Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium*. **Molecular Vision**, n. 11, p.816-824, 2005.

YAMAGUCHI, Takefumi; NEGISHI, Kazuno; YAMAGUCHI, Kazuko; MURAT, Dogru; UCHINO, Yuichi; SHIMMURA, Shigeto; TSUBOTA, Kazuo. *Effect of anterior and posterior corneal surface irregularity on vision after Descemet-stripping endothelial keratoplasty*. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 35, n. 4, p.688-694, 2009.

YAMAGUCHI, Takefumi; OHNUMA, Kazuhiko; DAISUKE, Tomida; KONOMI, Kenji; SATAKE, Yoshiyuki; NEGISHI, Kazuno; TSUBOTA, Kazuo; SHIMAZAKI, Jun. *The contribution of the posterior surface to the corneal aberrations in eyes after keratoplasty*. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 9, p.6222-6229, 2011.

YOERUEK, Efdal; BAYYOUNG, Tarek; HOFMANN, Johanna; SZURMAN, Peter; BARTS-SCHMIDT, Karl-Ulrich. *Comparison of pneumatic dissection and forceps dissection in Descemet membrane endothelial keratoplasty: histological and ultrastructural findings*. **Cornea**, v. 31, n. 8, p.920-925, 2012.

YOERUEK, Efdal; BAYYOUNG, Tarek; HOFMANN, Johanna; BARTS-SCHMIDT, Karl-Ulrich. *Novel maneuver facilitating Descemet membrane unfolding in the anterior chamber*. **Cornea**, v. 32, n. 3, p.370-373, 2013.

ZIEBARTH, Noël M.; DIAS, Janice; HURMERIC, Volkan; SHOUSHA, Mohamed Abou; YAU, Chiyat Ben; MOY, Vincent T. *et al. Quality of corneal lamellar cuts quantified using atomic force microscopy*. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 39, n. 1, p.110-117, 2013.

ZIEBARTH, Noël M.; LORENZO, Michael A.; CHOW, Jessica; CABOT, Florence; SPOONER, Gregory J.; DISHLER, Jon *et al. Surface quality of human corneal lenticules after SMILE assessed using environmental scanning electron microscopy*. **Journal of Refractive Surgery**, v. 30, n. 6, p.388-393, 2014.

ZYGO CORPORATION. **MetroPro reference guide version 90**. Middlefield: Zygo Corporation, 2011.

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Pelo presente instrumento, eu _____

residente e domiciliado _____ Nº _____

Bairro _____ cidade _____ UF _____ CEP _____

natural de _____ telefone: (____) _____ - _____ CPF _____

CI nº _____ emitida por _____ na qualidade de _____

responsável pelo paciente _____

natural de _____ data de nascimento ____/____/____, CPF _____

CI nº _____ emitida por _____

residente e domiciliado _____ Nº _____

Bairro _____ cidade _____ JF _____ CEP _____

Filiação _____ e _____ falecido no

estabelecimento _____, cidade _____ UF _____

Autorizo, por minha inteira responsabilidade e por livre e espontânea vontade, a proceder coleta de sangue para exames sorológicos e a retirada dos globos oculares, para fins de transplantes, com objetivos terapêuticos e fins científicos, em conformidade com as disposições da Lei nº 9.434 de 04/02/1997, alterada pela Lei nº 10.211 de 23/03/2001, Decreto nº 2.268 de 30/06/1997 e a Portaria GM nº 263 de 31/03/1999.

Fica ressalvado que a utilização para fins científicos é aqui autorizada somente depois de esgotadas as possibilidades de utilização para transplante.

Esta autorização é motivada apenas por razões humanitárias, sem expectativa de receber nenhuma forma de compensação. O(s) nome(s) do(s) receptor(es) não será(o) comunicado(s) à família do doador.

Excepcionalmente poderá ocorrer hematoma ou sangramento na região palpebral do doador.

As informações deste termo são de total responsabilidade do declarante, sobretudo o grau de parentesco com o doador.

_____, _____ de _____ de _____

Assinatura do responsável

Assinatura do responsável pela abordagem

Testemunhas

Nome: _____ CI: _____

Endereço: _____ Tel: (____) _____

Assinatura: _____

Nome: _____ CI: _____

Endereço: _____ Tel: (____) _____

Assinatura: _____

ANEXO B**Parecer COEP / UFMG / Plataforma Brasil**

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA: ANÁLISE DA SUPERFÍCIE E ESPESSURA DE BOTÕES CORNEANOS UTILIZADOS PARA TRANSPLANTE ENDOTELIAL.

PESQUISADOR: JOEL EDMUR BOTEON.

CAAE: 09080513.3.0000.5149.

INSTITUIÇÃO PROPONENTE: FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG.

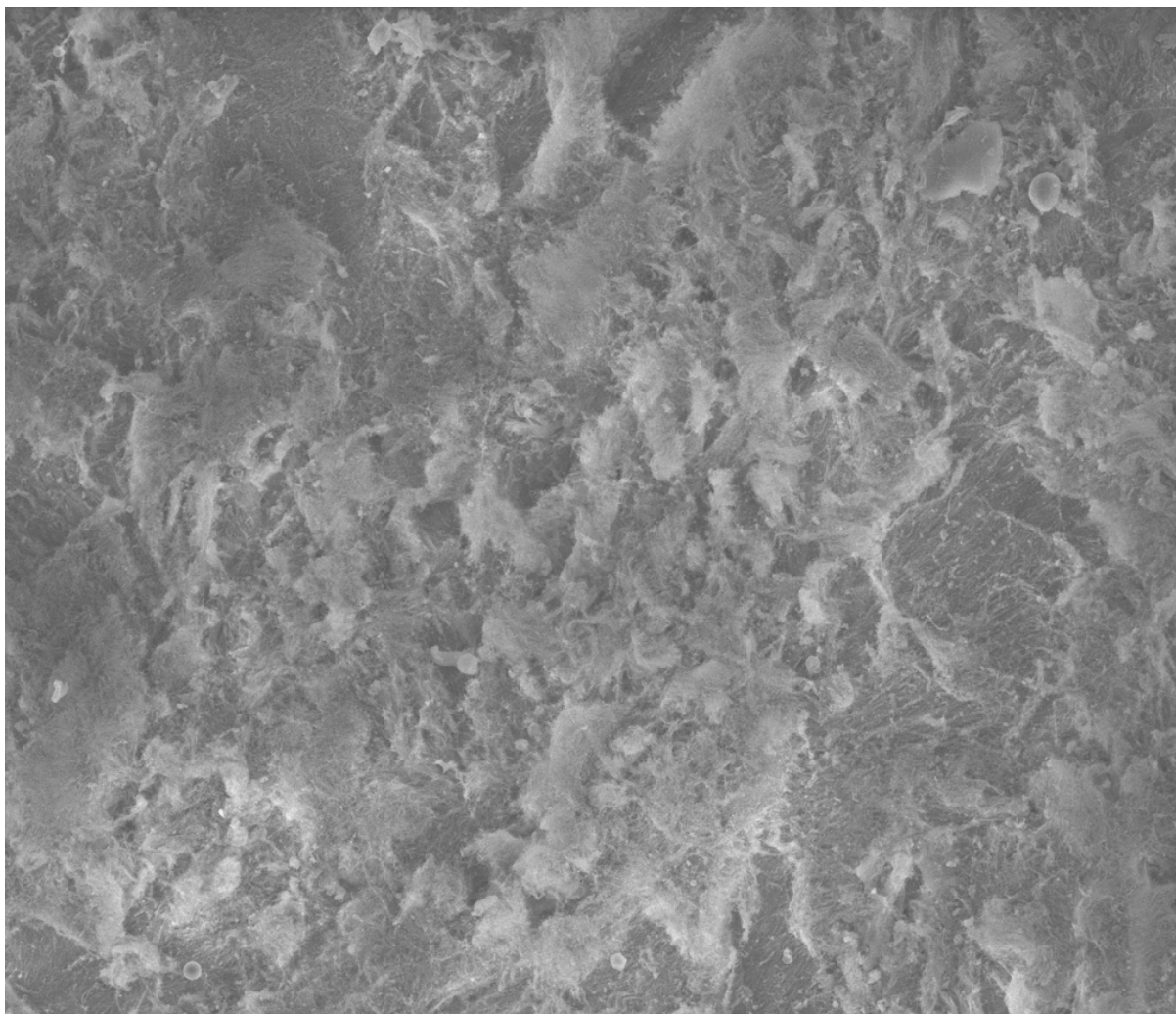
SITUAÇÃO: APROVADO.

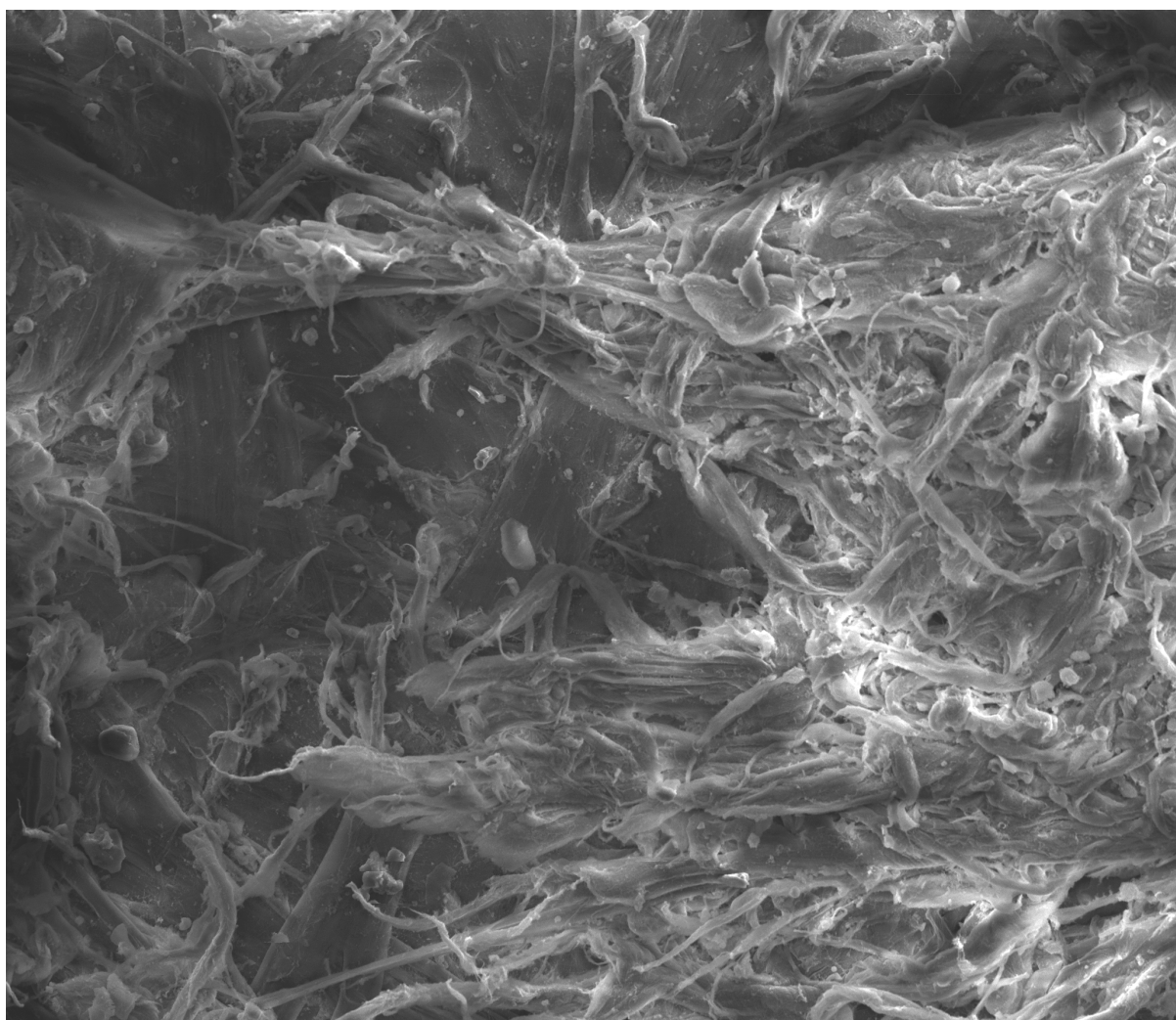
ANEXO C

Protocolo de Preparação de Amostras Biológicas para MEV-Ácido Tânico

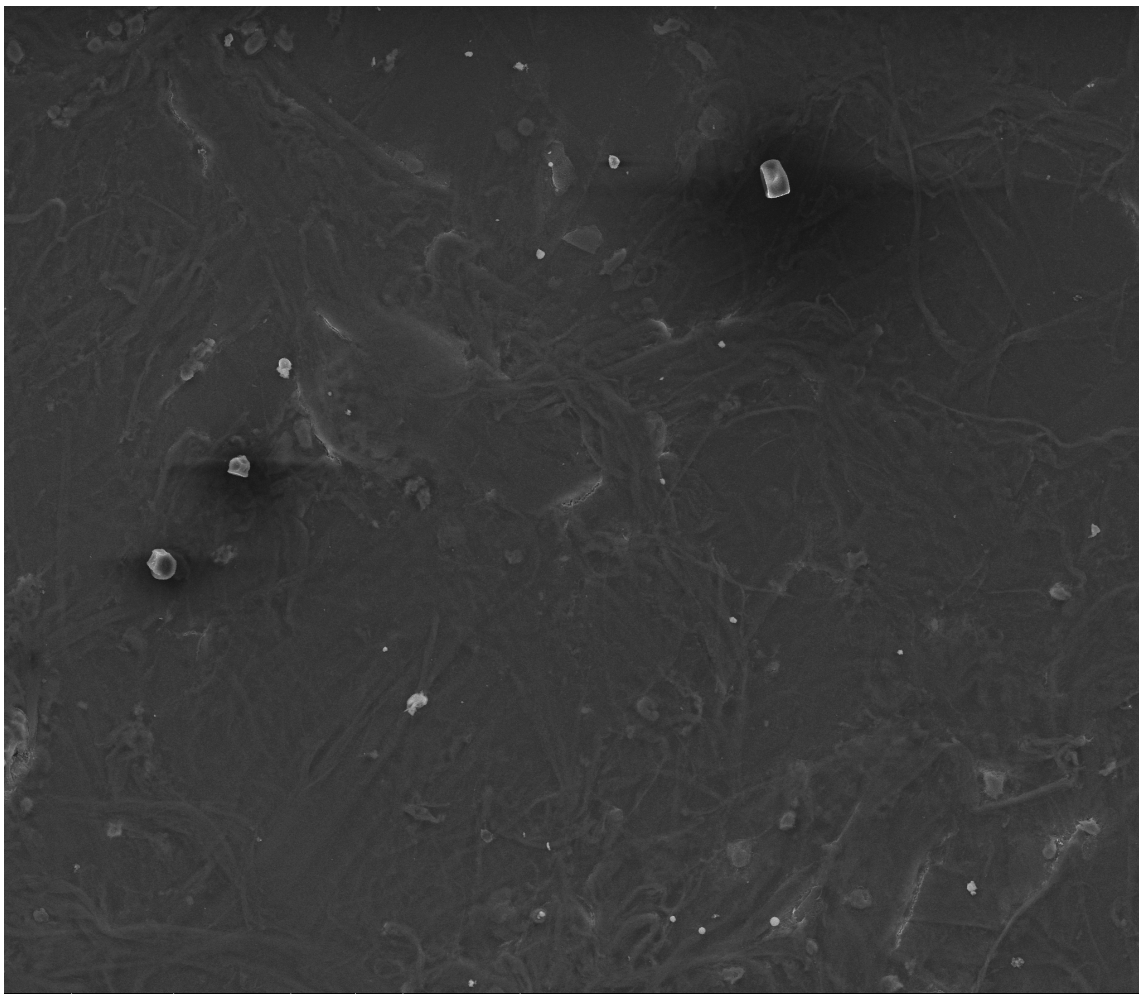
Fixar as amostras com fixador primário modificado: * Karnovsky (2,0% paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído), em tampão fosfato 0,1M e ou tampão cacodilato 0,1M por no mínimo 01 hora.

1. Remover o fixador e lavar as amostras 3X (10 minutos) em tampão fosfato e/ou cacodilato 0,1M;
2. Imergir as amostras no fixador secundário** por 1 hora; (**tetróxido de ósmio 1,0%).
3. Lavar novamente as amostras por 3X (10 minutos) em tampão fosfato e ou cacodilato 0,1M;
4. Imergir as amostras em Ácido Tânico 1% em tampão fosfato e ou cacodilato 0,1M por 20 minutos.
5. Lavar novamente as amostras por 3X (10 minutos) em tampão fosfato e ou cacodilato 0,1M;
6. Imergir as amostras no fixador secundário** por 1 hora; (**tetróxido de ósmio 1,0%).
7. Lavar novamente as amostras por 3X (10 minutos) em água destilada.
9. Desidratar as amostras em solução crescente de Álcool etílico 35%,50%, 70%, 85% e 95% (10 minutos) e em 100% (3X-10 minutos).
10. Realizar a secagem das amostras no ponto crítico de CO₂
11. Montar as amostras nos stubs usando fita de carbono.
12. Metalizar as amostras com ouro, 3nm de espessura.
13. Fotografar e documentar as amostras ao MEV.

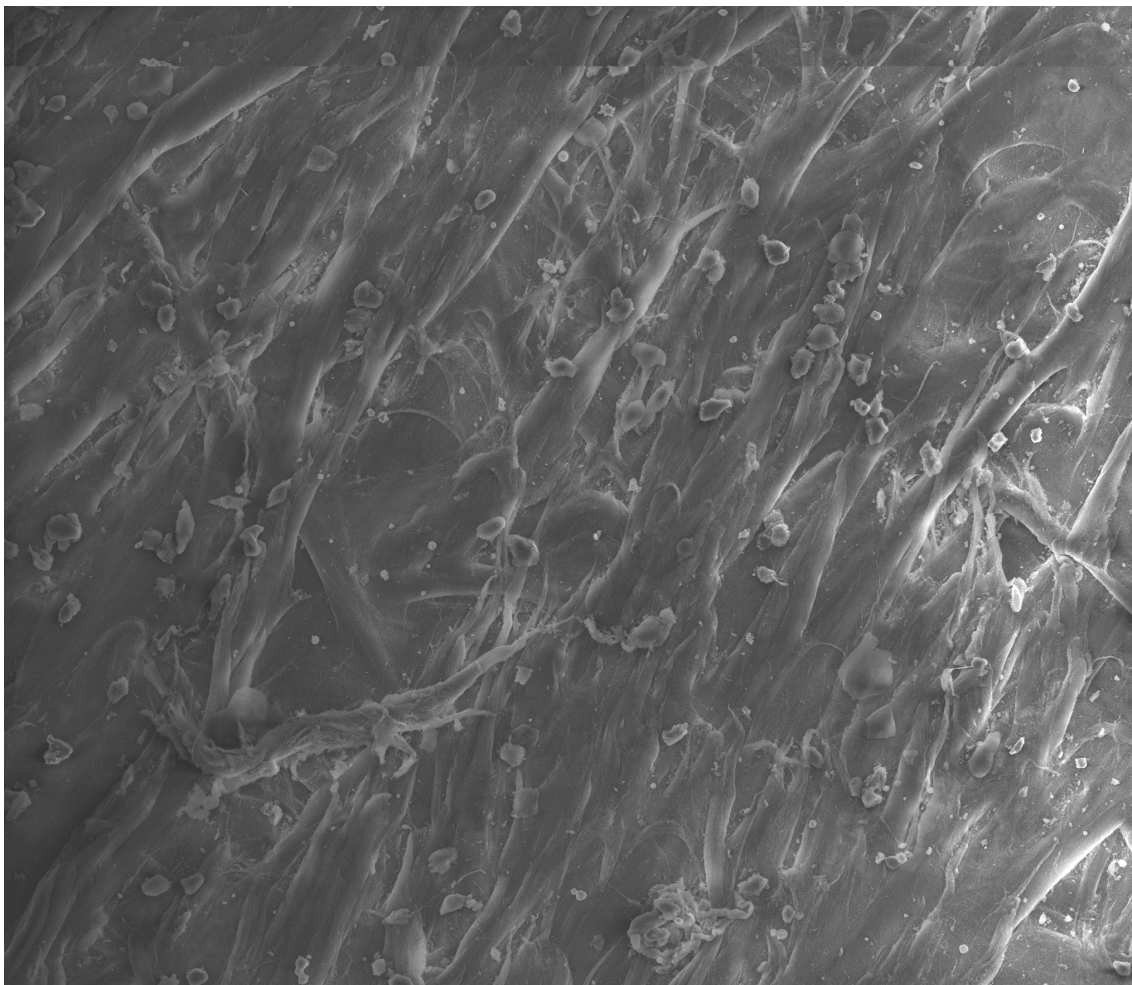
APÊNDICE A**Cartas para Classificação Subjetiva das Amostras Através da Microscopia
Eletrônica de Varredura****Carta 1: Grupo 1 – Rugoso.**



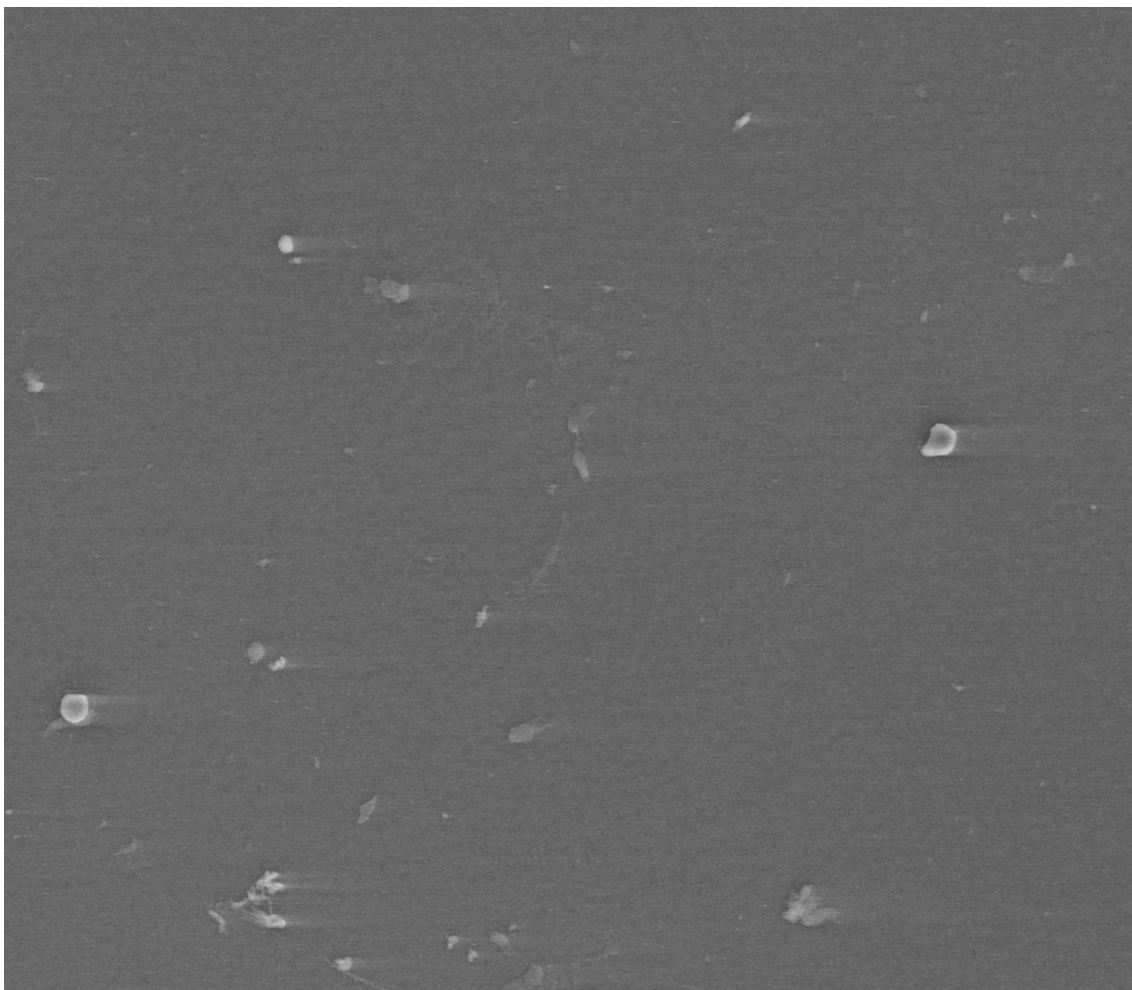
Carta 2: Grupo 1 – Rugoso.



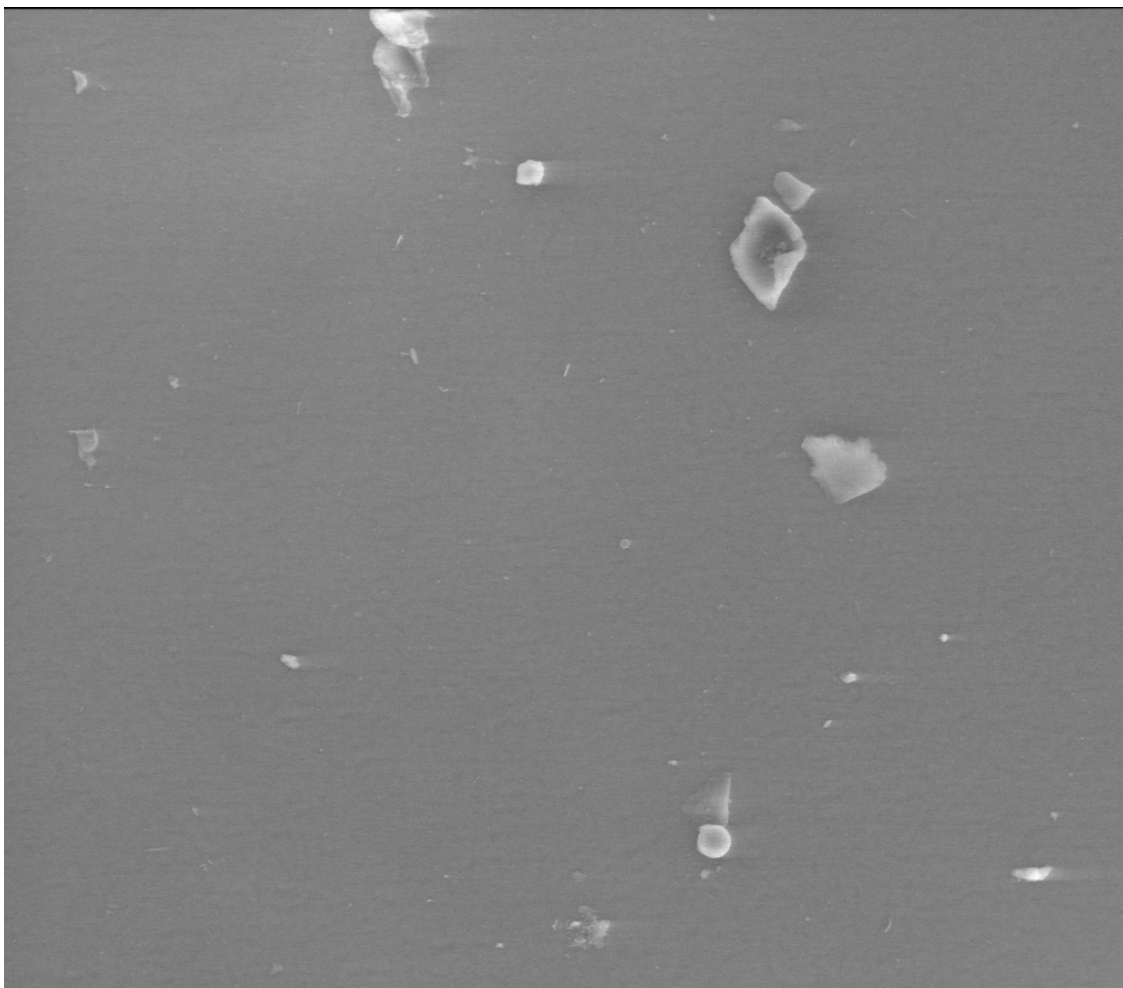
Carta 3: Grupo 2 – Intermediário.



Carta 4: Grupo 2 – Intermediário.



Carta 5: Grupo 3 – Liso.

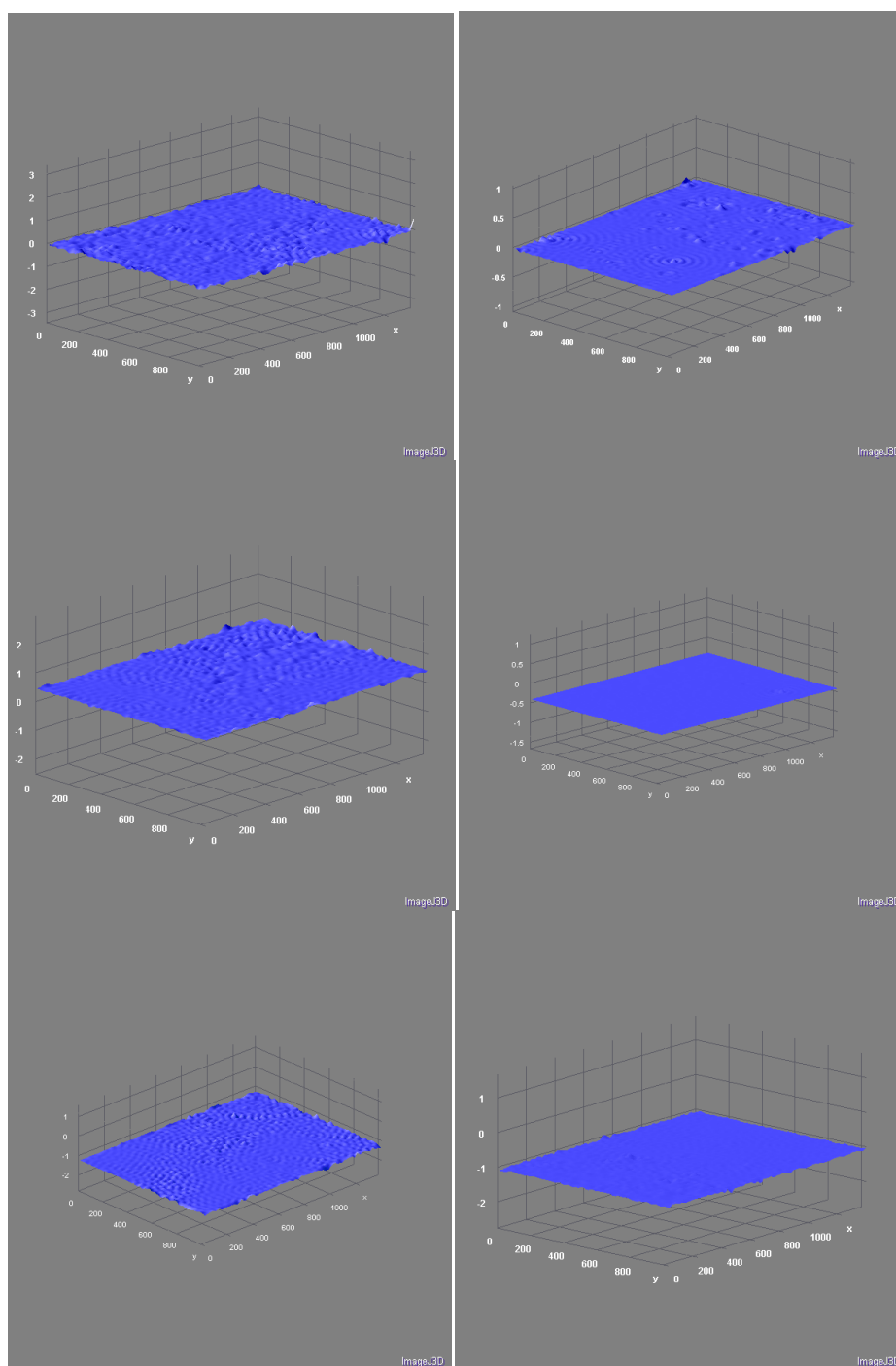


Carta 6: Grupo 3 – Liso.

APÊNDICE B

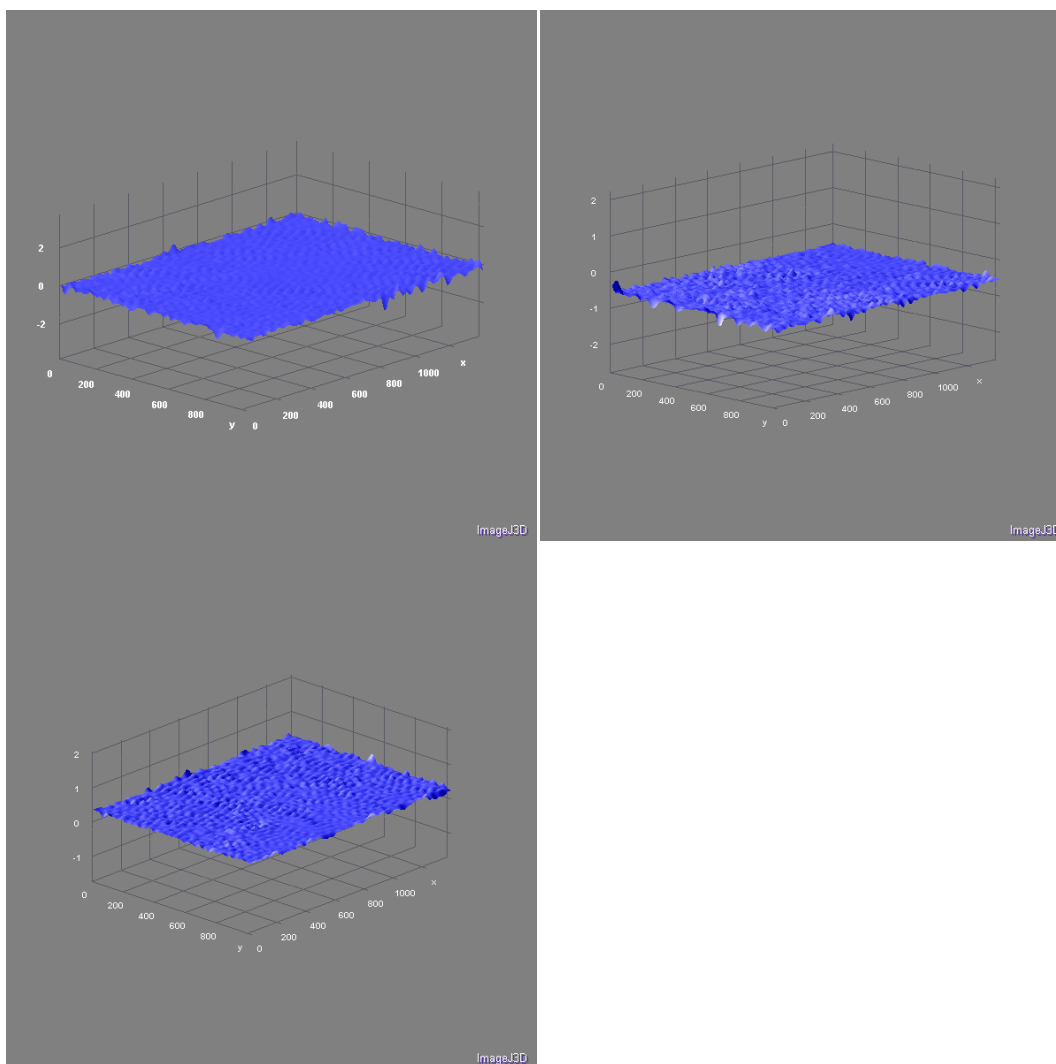
Figuras obtidas com as técnicas de microscopia de desfocalização, microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica.

Figura 10: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em seis amostras preparadas através da técnica DMEK.



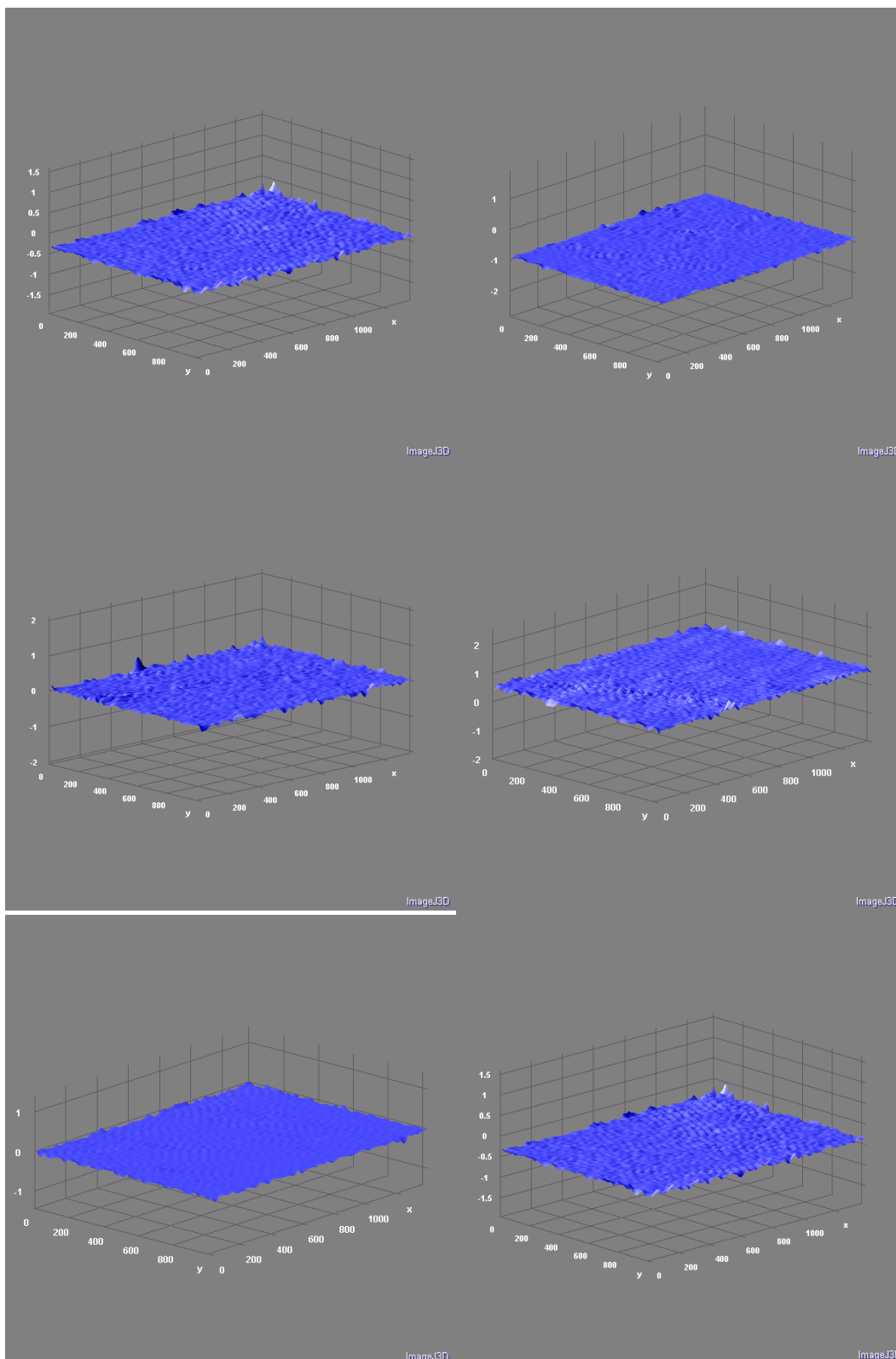
Fonte: Material próprio do autor

Figura 11: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em três amostras preparadas através da técnica DSAEK 1.



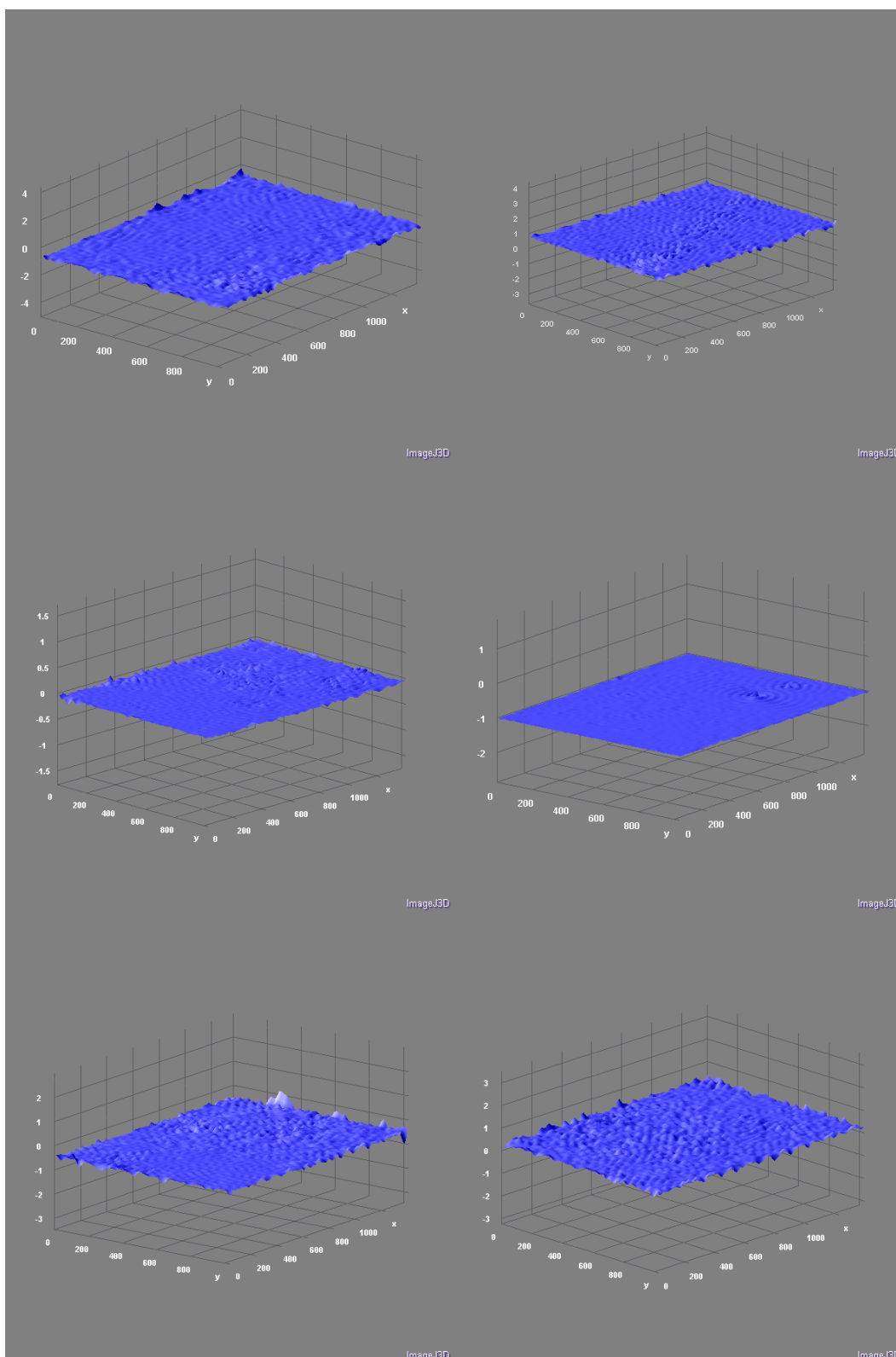
Legenda: Aumento de 20X.
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 12: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSAEK 2.



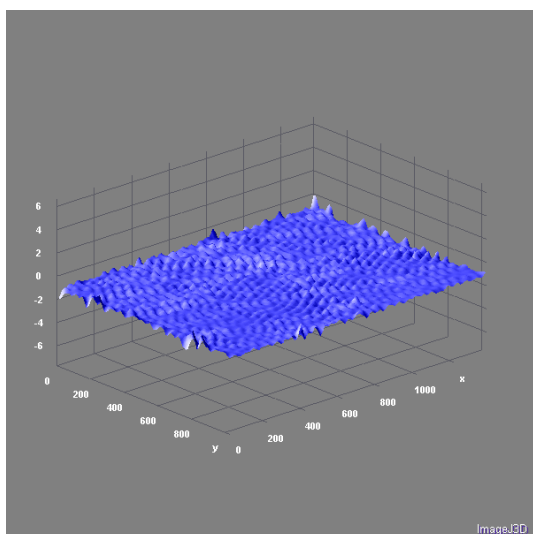
Legenda: Aumento de 20X.
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 13: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em sete amostras preparadas através da técnica DSEK 1.



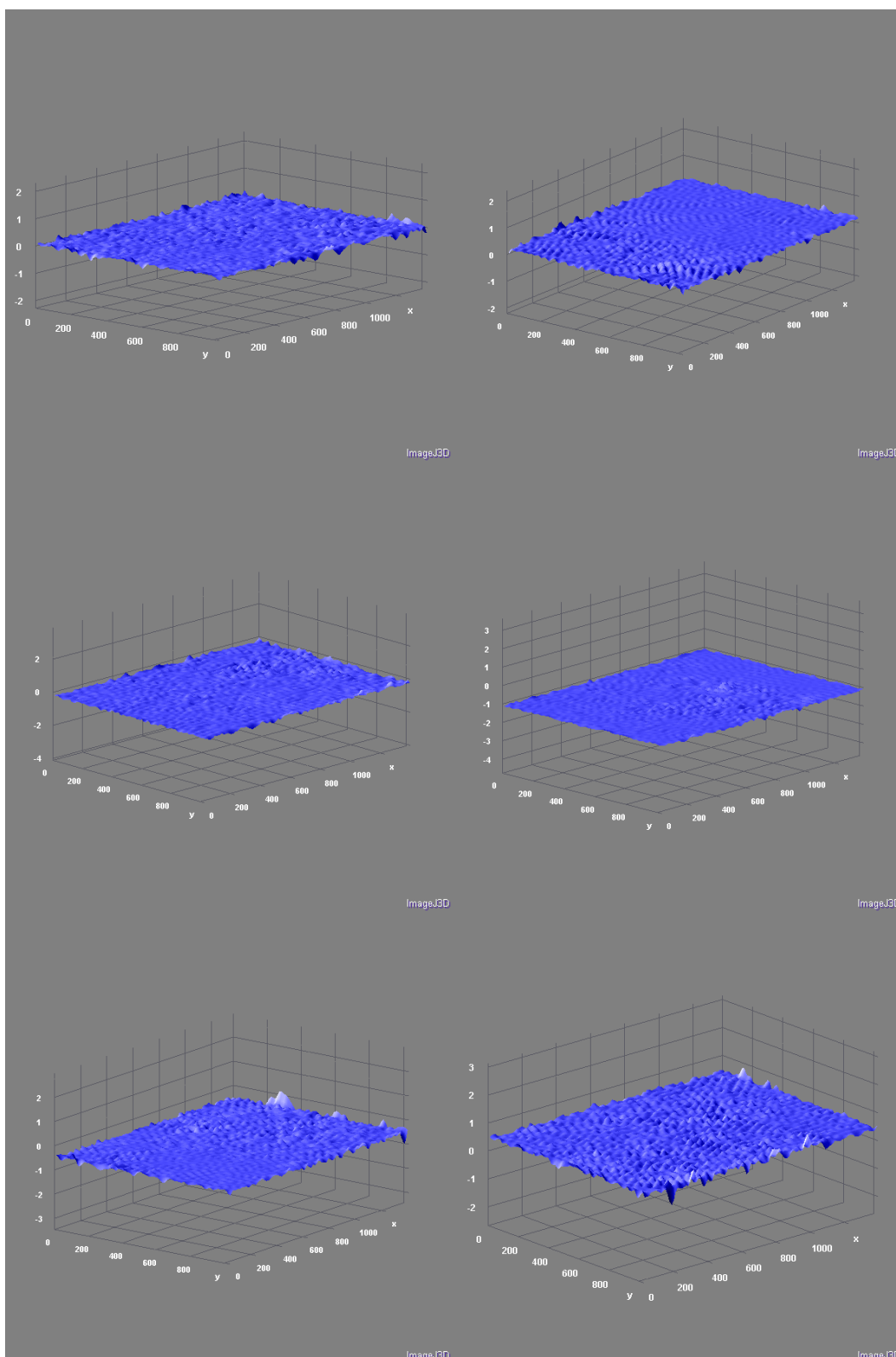
Legenda: Aumento de 20X.
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 14: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em sete amostras preparadas através da técnica DSEK 1.



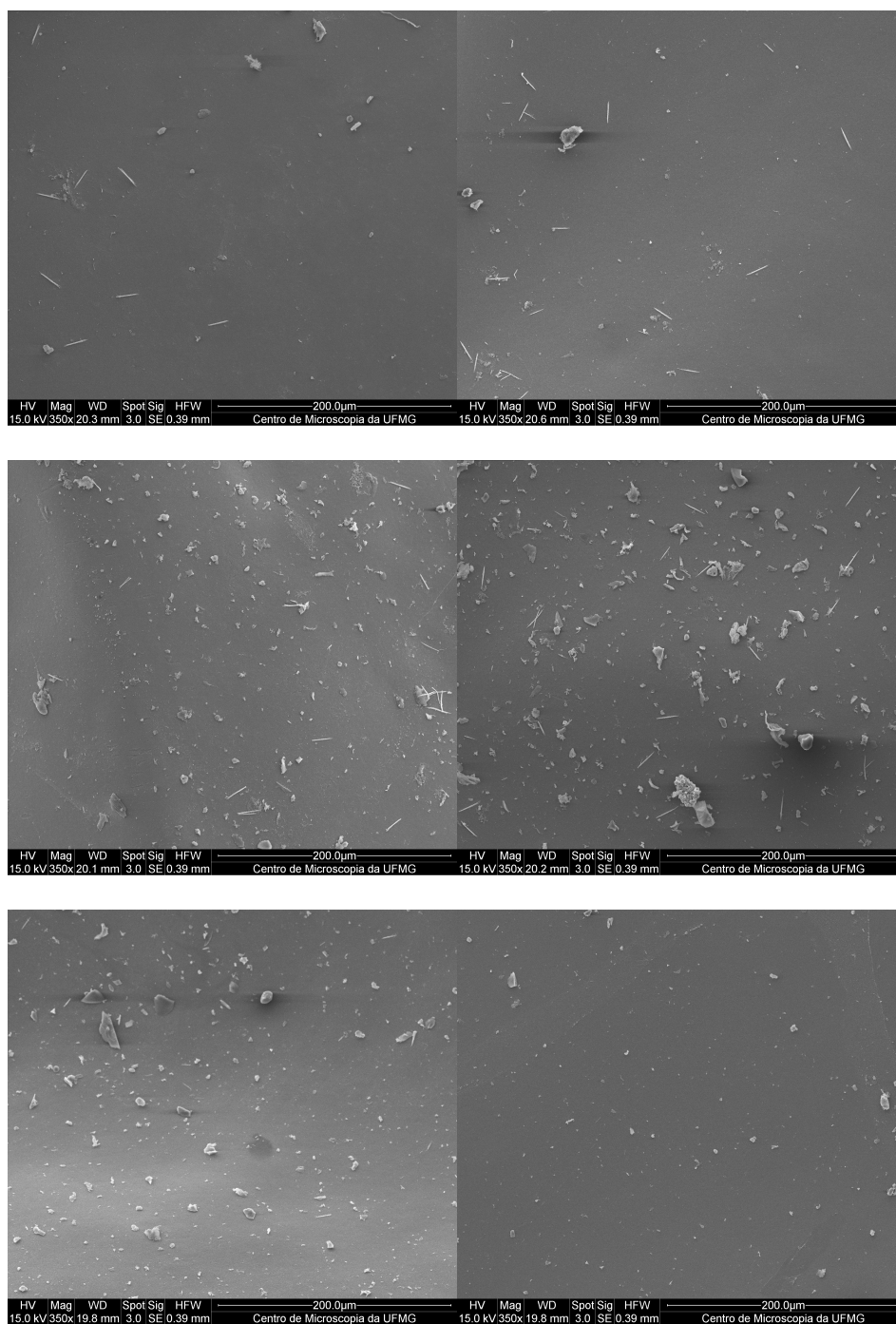
Legenda: Aumento de 20X.
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 15: Imagens da técnica de microscopia de desfocalização realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSEK 2.



Legenda: Aumento de 20X.
Fonte: Acervo pessoal do autor.

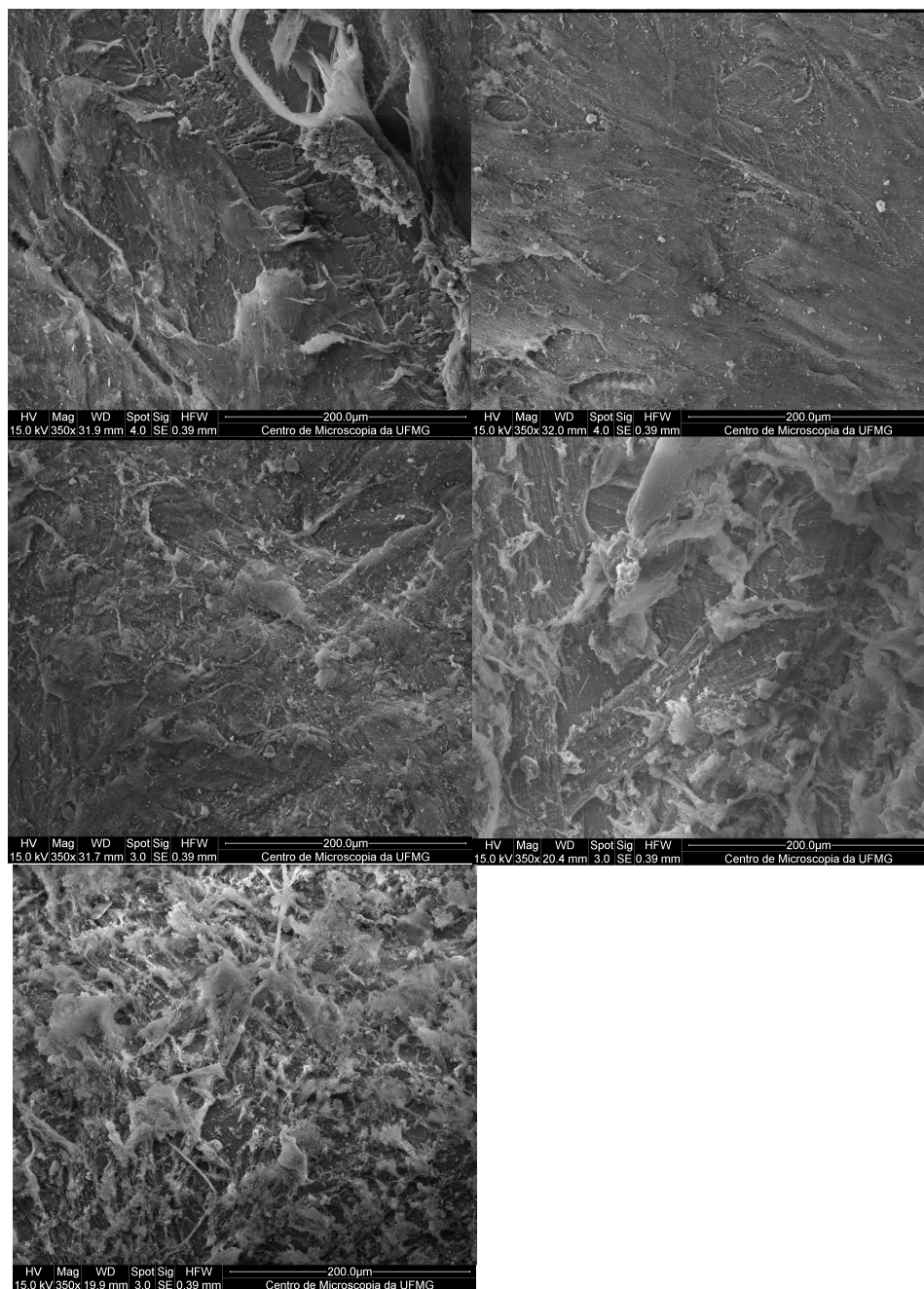
Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura realizada em seis amostras preparadas através da técnica DMEK.



Legenda: DMEK- *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty* HV-High Voltage Mag-Magnification: 350X Spot –mira SE-Secondary Electron HFW – Horizontal Field Width.

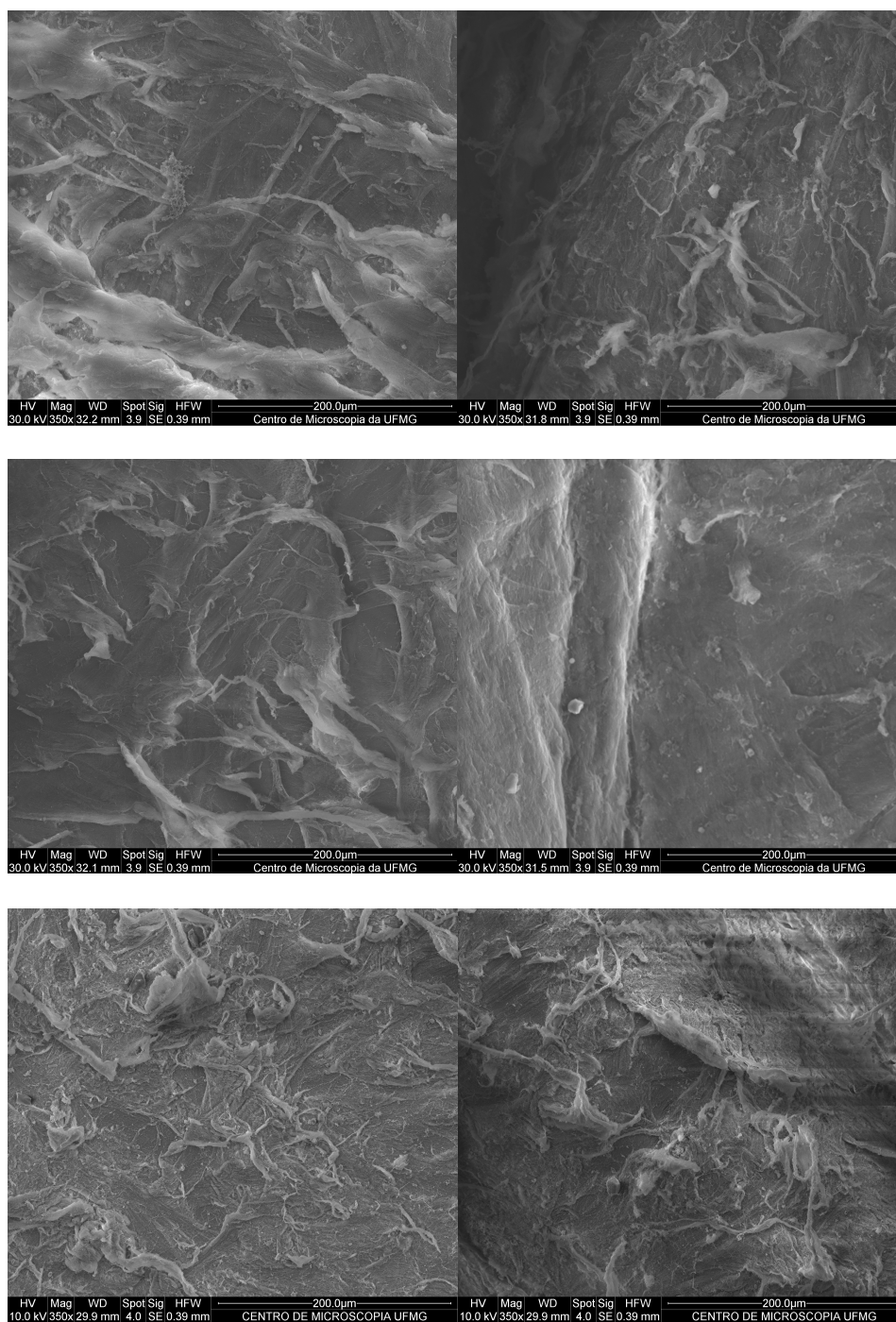
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura realizada em cinco amostras preparadas através da técnica DSAEK 1 .



Legenda: DSAEK- *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty* HV-High Voltage Mag- Magnification: 350X Spot –mira SE-Secondary Electron HFW – Horizontal Field Width.
Fonte: Acervo pessoal do autor.

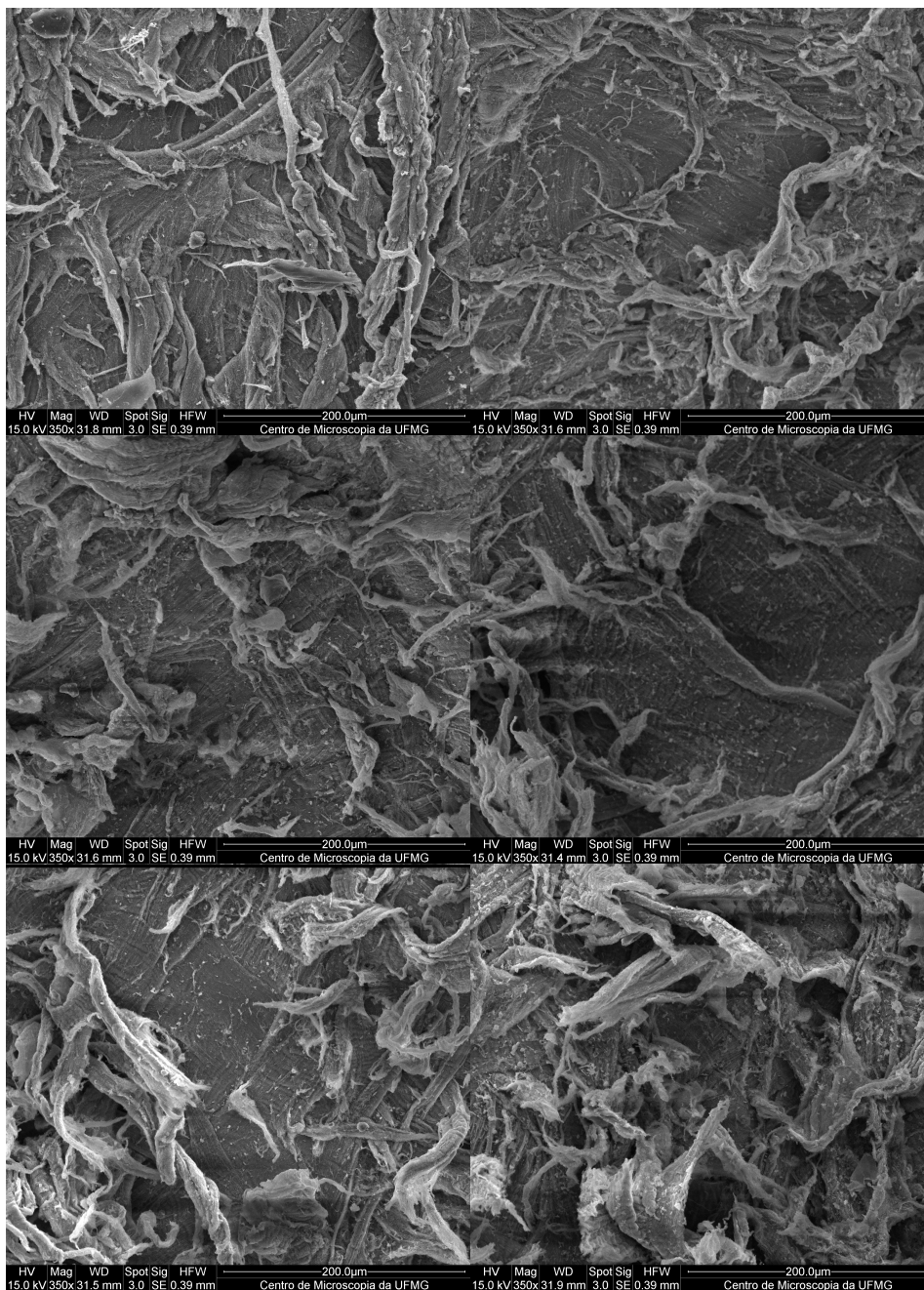
Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSAEK 2.



Legenda: DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty* HV-High Voltage Mag-Magnification: 350X Spot –mira SE-Secondary Electron HFW – Horizontal Field Width.

Fonte: Acervo pessoal do autor.

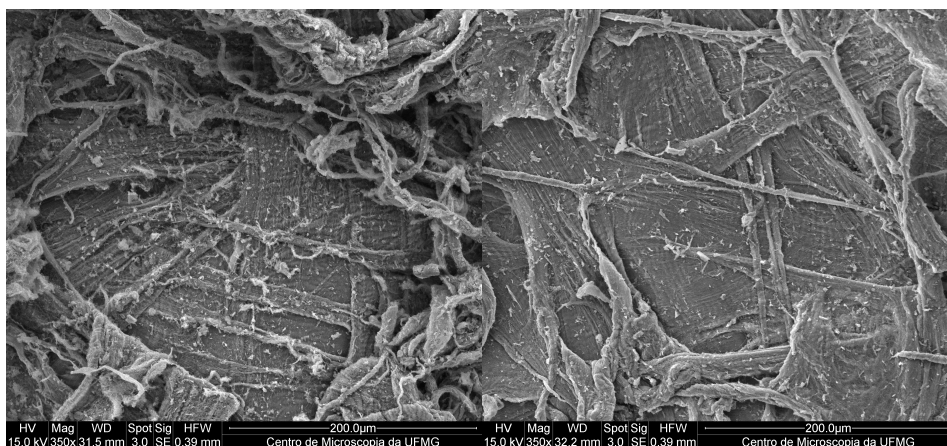
Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura através do aparelho Quanta com aumento de 350X realizada em oito amostras preparadas através da técnica DSEK 1.



Legenda: DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty* HV-High Voltage Mag-Magnification: 350X Spot –mira SE-Secondary Electron HFW – Horizontal Field Width.

Fonte: Acervo pessoal do autor.

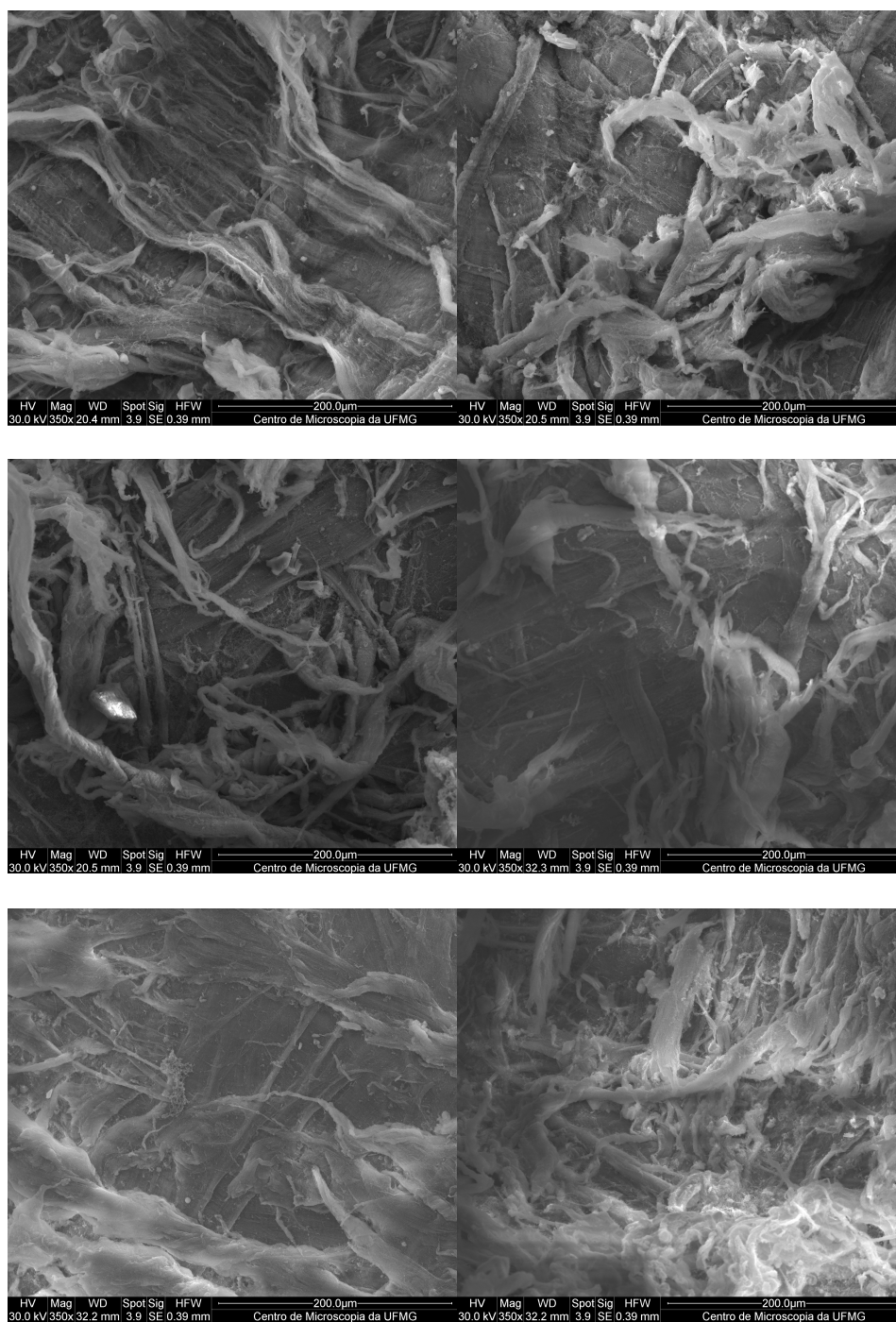
Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura realizada em oito amostras preparadas através da técnica DSEK 1.



Legenda: DSEK – *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty* HV-High Voltage Mag-Magnification: 350X Spot –mira SE-Secondary Electron HFW – Horizontal Field Width.

Fonte: Acervo pessoal do autor.

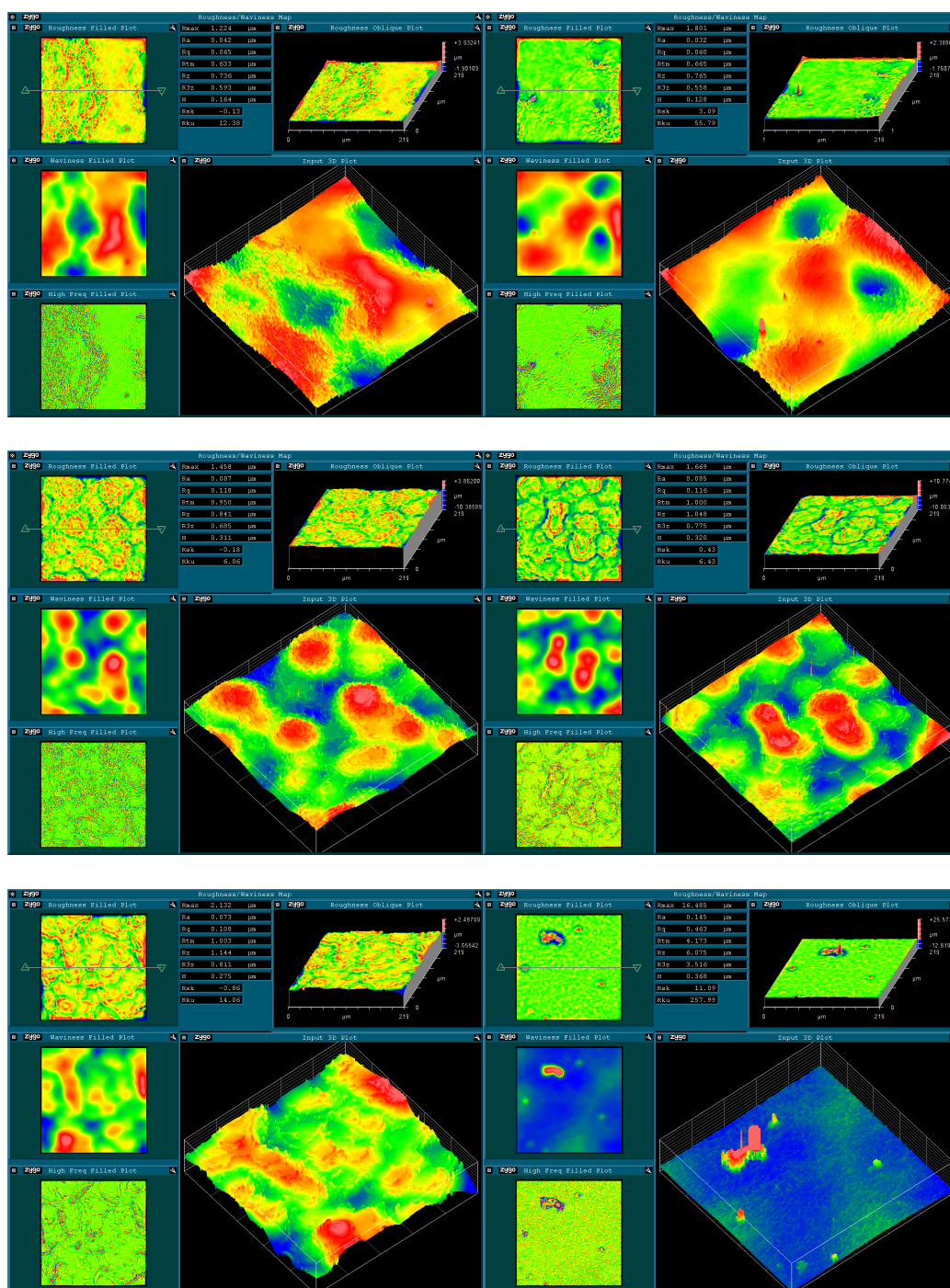
Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSEK 2.



Legenda: DSEK – *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty* HV-High Voltage Mag-Magnification 350X Spot –mira SE-Secondary Electron HFW – Horizontal Field Width.

Fonte: Acervo pessoal do autor.

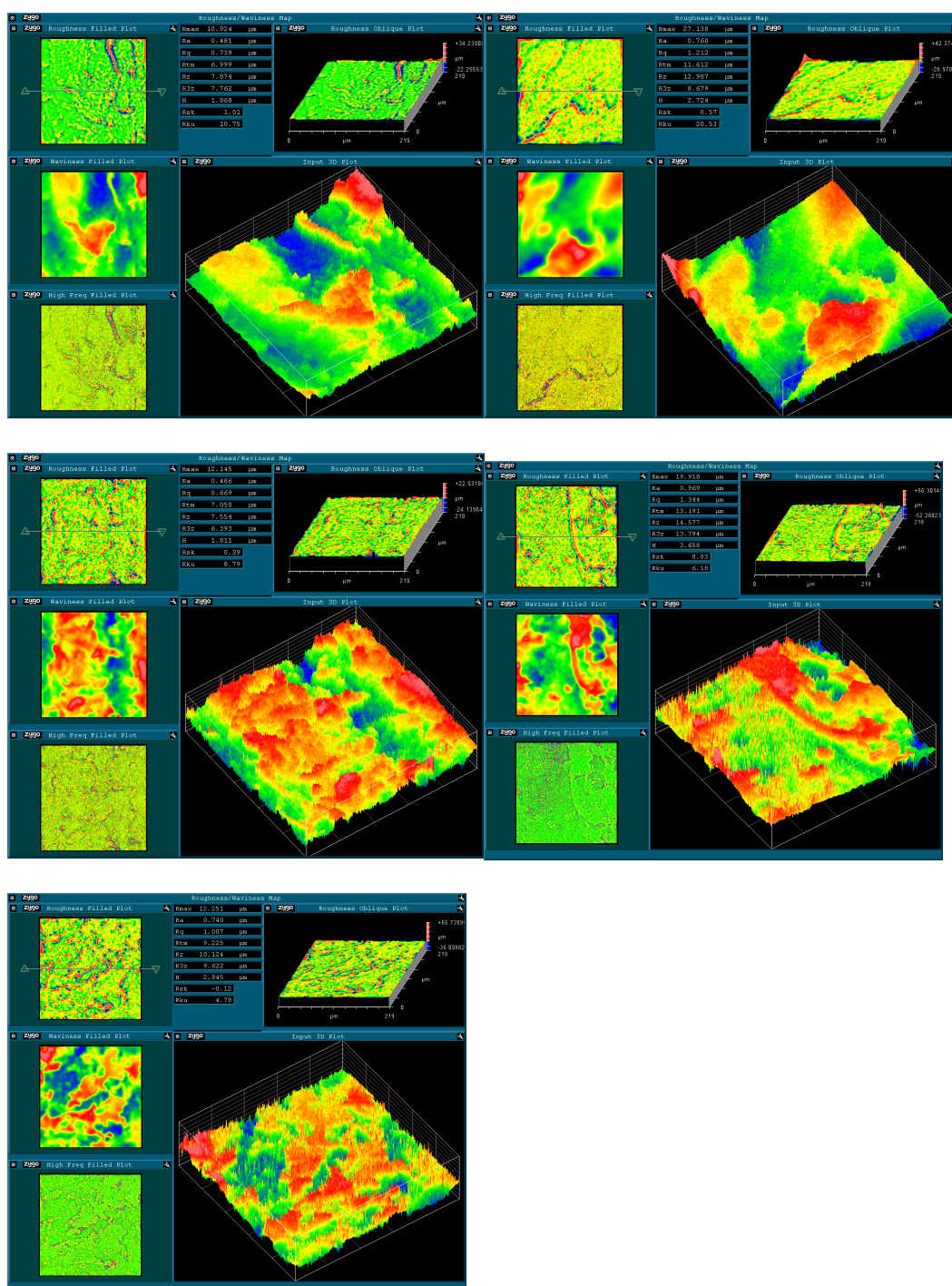
Figura 22: Perfilometria óptica realizada em seis amostras preparadas através da técnica DMEK .



Legenda: DMEK – Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty; aumento de 50X (área analisada de 220 x 220 micrômetros).

Fonte: Acervo pessoal do autor.

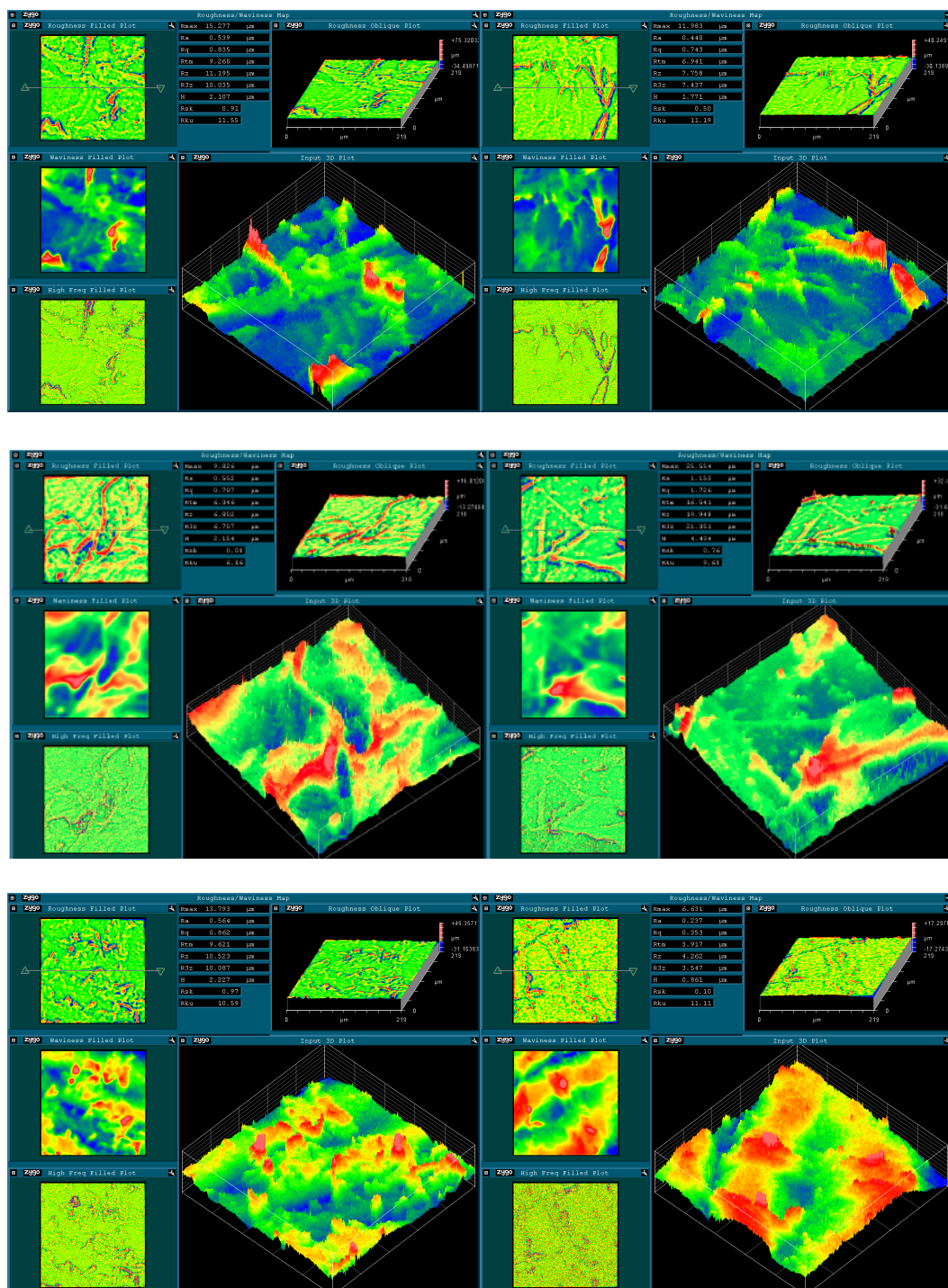
Figura 23: Perfilometria óptica realizada em cinco amostras preparadas através da técnica DSAEK 1.



Legenda: DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*; aumento de 50X (área analisada de 220 x 220 micrômetros).

Fonte: Acervo pessoal do autor.

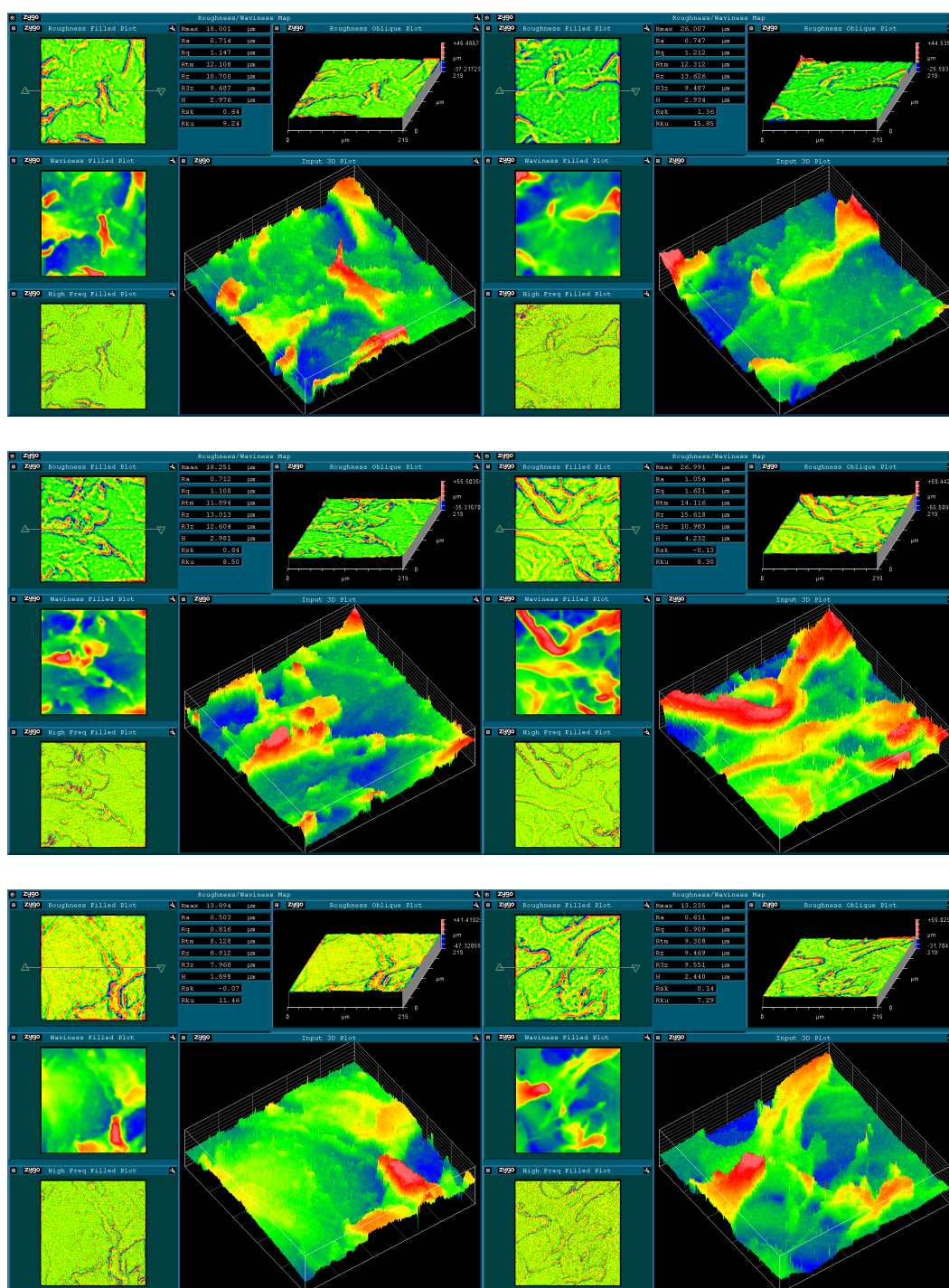
Figura 24: Perfilometria óptica realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSAEK 2.



Legenda: DSAEK – Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; aumento de 50X (área analisada de 220 x 220 micrômetros).

Fonte: Acervo pessoal do autor.

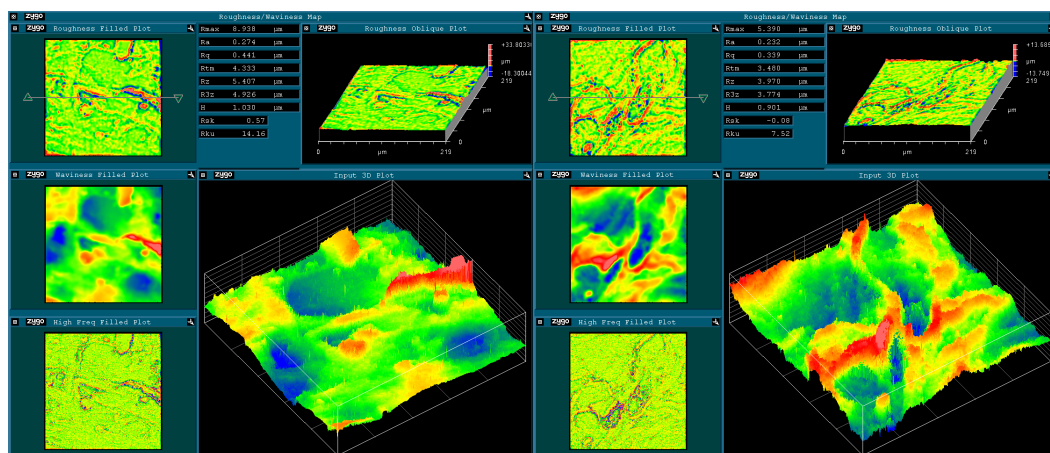
Figura 25: Perfilometria óptica realizada em oito amostras preparadas através da técnica DSEK 1.



Legenda: DSAEK – Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; aumento de 50X (área analisada de 220 x 220 micrômetros).

Fonte: Acervo pessoal do autor.

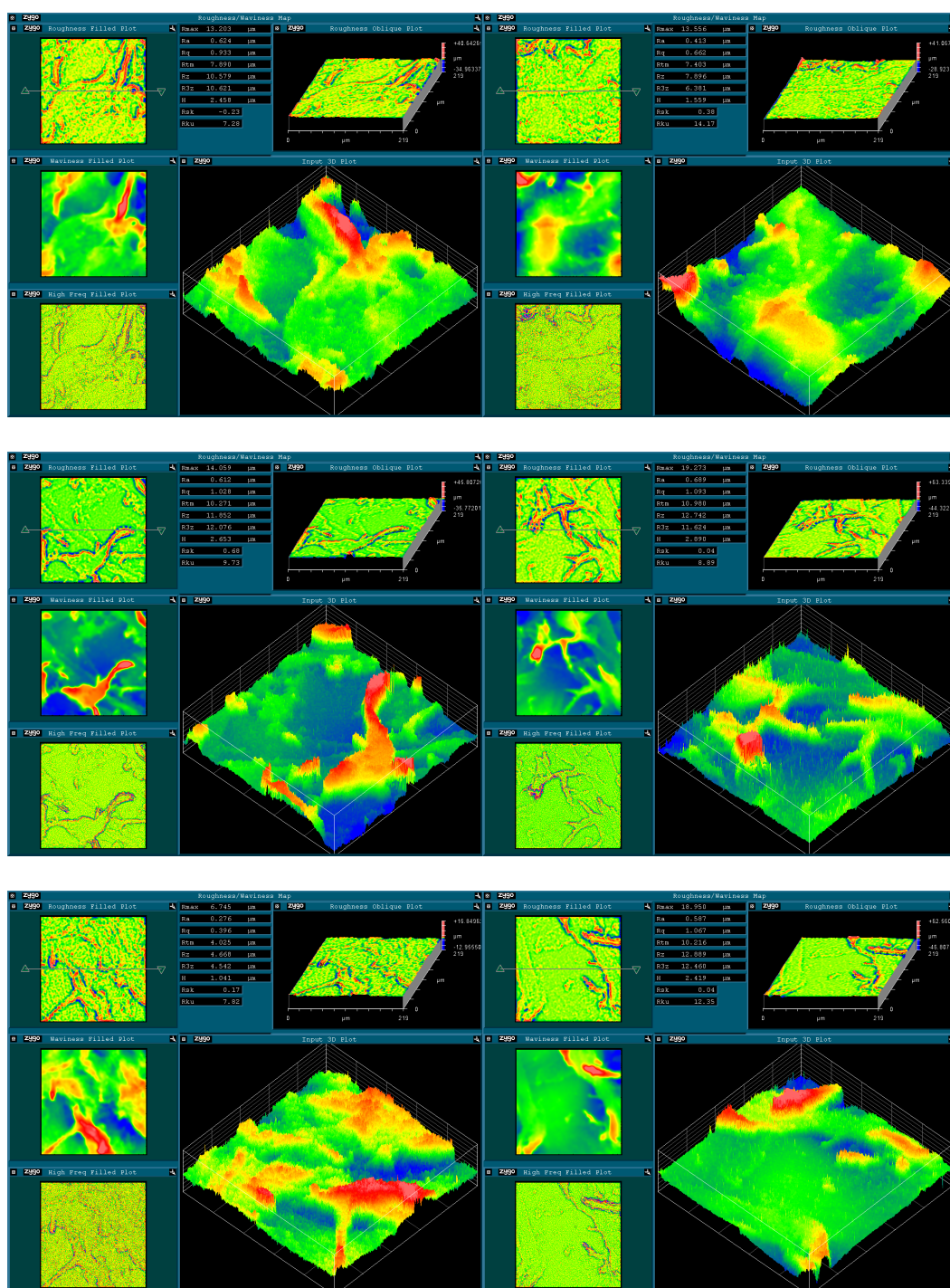
Figura 26: Perfilometria óptica realizada em oito amostras preparadas através da técnica DSEK 1.



Legenda: DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*; aumento de 50X (área analisada de 220 x 220 micrômetros).

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 27: Perfilometria óptica realizada em seis amostras preparadas através da técnica DSEK 2.



Legenda: DSEK – Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty; aumento de 50X (área analisada de 220 x 220 micrômetros).

Fonte: Acervo pessoal do autor.