

Utilização do programa Cells Analyser® no estudo comparativo entre imagens do endotélio de córneas obtidas por microscopia especular

Using of Cells Analyser® software in the study of image of corneal specular microscope endothelial samples

Cinthia Mendonça de Melo¹
Procópio Miguel dos Santos²
Regina Cândido Ribeiro dos Santos³
Fernando César Abib⁴

RESUMO

Objetivos: Conhecer diferenças entre o número de células, área endotelial avaliada e erro amostral, comparando amostras endoteliais de uma única imagem endotelial, com amostras endoteliais constituídas pelo número de células e imagens, orientadas por software específico. **Métodos:** Foi realizado estudo transversal, comparando as amostras endoteliais com e sem a intervenção do software. A amostra foi composta de 157 olhos. Foram criados 2 grupos: Grupo 1: composto pelos dados amostrais da primeira imagem dos exames; Grupo 2: composto pelos dados amostrais que consideram o número de imagens necessárias para que o exame seja considerado completo pelo software Cells Analyser PAT.REC. (Grau de confiança 95% e erro relativo 0,05). Os dados amostrais comparados foram número de células contadas, área da amostra endotelial e erro amostral. Utilizou-se o teste *t* Student bicaudal, para amostras pareadas, com nível de 99% ($p < 0,01$). **Resultados:** 157 (52,69%) exames necessitaram de mais de uma imagem endotelial para que se superasse o número mínimo de células endoteliais necessárias. Evidenciou-se diferença estatisticamente significativa, do número de células das amostras endoteliais ($p = 4 \times 10^{-24}$), da área endotelial avaliada ($p = 2 \times 10^{-18}$) e do erro amostral ($p = 1 \times 10^{-21}$) entre o Grupo 1 e o Grupo 2. **Conclusão:** O estudo dos dados amostrais sem e com a intervenção do software Cells Analyser®, mostraram-se estatisticamente diferentes, com amostras maiores e erros amostra.

Descritores: Endotélio da córnea; Microscopia/métodos; Análise estatística; Software; Reprodutibilidade dos testes; Estudo comparativo

INTRODUÇÃO

O endotélio corneal é formado por uma camada única de células hexagonais aderidas à membrana de Descemet, que revestem posteriormente a córnea. Exerce as funções de barreira à entrada de fluidos e de bomba ativa para transporte de íons e água para a câmara anterior, mantendo a transparência corneana e prevenindo o edema da córnea, que pode levar à baixa da visão⁽¹⁻³⁾.

A microscopia especular é uma técnica não invasiva, de fácil realização, baseada na reflexão de um feixe luminoso incidente sobre a superfície do endotélio corneal, onde parte deste feixe luminoso reflete de forma especular, é captada pelo aparelho denominado microscópio especular de córnea. A ampliação da imagem captada faz-se por um sistema óptico-

Trabalho realizado na Universidade de Brasília - UnB - Brasília (DF) - Brasil e no Laboratório de Microscopia Especular de Córnea da Clínica de Olhos Dr. Fernando Abib - Curitiba (PR) - Brasil.

¹ Pós-graduanda da Universidade de Brasília - UnB - Brasília (DF) - Brasil.

² Professor da Faculdade de Medicina do Distrito Federal - FEPECS - Brasília (DF) - Brasil; Professor de Pós-Graduação da UnB - Brasília (DF) - Brasil.

³ Professora da Faculdade de Medicina do Distrito Federal - FEPECS - Brasília (DF) - Brasil; Professora de Pós-Graduação da UnB - Brasília (DF) - Brasil.

⁴ Doutor, Professor Adjunto do Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal do Paraná - UFPR - Curitiba (PR) - Brasil.

Endereço para correspondência: Cinthia Mendonça de Melo, 106 Sul - Alameda 01 - Lote 03 - Apto. 201 - Ed. Cananéia - Plano Diretor Sul - Palmas (TO) CEP 77020-054
E-mail: cinmelo@hotmail.com

Recebido para publicação em 21.02.2007

Última versão recebida em 04.04.2007

Aprovação em 05.04.2007

Nota Editorial: Depois de concluída a análise do artigo sob sigilo editorial e com a anuência dos Drs. Maria Cristina Nishiwaki-Dantas e Sérgio Felberg sobre a divulgação de seus nomes como revisores, agradecemos sua participação neste processo.

eletrônico para então ser direcionada a um software que realizará a análise quantitativa e qualitativa do endotélio corneal⁽⁴⁻⁵⁾.

A microscopia especular é um recurso importante para o estudo da morfologia endotelial afirmativa da Academia Americana de Oftalmologia⁽⁶⁾, corroborada por outros autores^(1,7-11).

O software Cells Analyser® complementa a tecnologia dos microscópios especulares existentes, pela incorporação dos resultados destes equipamentos, obtendo o erro amostral e indicando o número de células que devem ser consideradas para tornar o resultado do exame endotelial representativo da realidade do mosaico endotelial como um todo, inferindo-lhes validade estatística e conseqüentemente médica, para melhor definirem diagnósticos e condutas clínicas e/ou cirúrgicas, de modo a elevar a qualidade deste procedimento a um novo patamar de confiabilidade médica⁽¹²⁾.

O objetivo desta pesquisa é determinar, para amostras endoteliais obtidas por meio de microscopia especular de córnea, se existe diferença entre o número de células, área endotelial avaliada e erro amostral, comparando a amostra endotelial de uma única imagem do mosaico com a amostra endotelial constituída pelo número de células, em tantas imagens do mosaico quanto necessário, conforme indicação do Cells Analyser®.

MÉTODOS

Dos 292 olhos incluídos no universo de exames estudados inicialmente, 135 (48,3%) foram considerados completos com uma única imagem, por apresentarem número de células suficientes e conseqüentemente com erro menor que 5%. Para efeito de comparação utilizaram-se somente os exames na qual foram necessárias mais de uma imagem endotelial. A amostra foi então constituída de 157 (51,7%) olhos restantes, de 80 pacientes com idade entre 13 e 87 anos com média de 48 e desvio padrão de 19 anos, que necessitaram de mais de uma imagem para obter representatividade do mosaico endotelial ao grau de confiança de 95% e erro amostral de 5%.

Os critérios de exclusão foram a presença de lesões complexas anexas ao mosaico endotelial que comprometam sua superfície posterior, de forma total ou parcial, como na córnea guttata, distrofia endotelial de Fuchs, distrofia polimorfa posterior e síndrome endotelial iridocorneal.

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

A captação das imagens endoteliais foi realizada com microscópio especular de contato com grande ampliação, semi-automatizado, marca Bio-Optics® modelo LSM 2000C.

Após a captura das imagens endoteliais, consideradas como amostras, todas as células contidas nas imagens foram marcadas pela técnica da marcação dos centros celulares. Em cada uma destas imagens os dados semiológicos (densidade endotelial, área celular, coeficiente de variação e percentual

de células hexagonais) foram calculados pelo software Bambi 2000 Plus. Estes dados semiológicos calculados, além do número de células contadas em cada imagem endotelial e da idade do paciente em exame, foram digitados no software Cells Analyser® para gerar os dados amostrais estudados (número total de células da amostra endotelial, área endotelial avaliada em μm^2 , área equivalente em mm^2 e erro relativo).

Para determinar o tamanho e o respectivo erro estatístico das amostras endoteliais examinadas utilizou-se grau de confiança de 95% e erro relativo 0,05 (5%). Por erro amostral entendeu-se o erro relativo calculado pelo software Cells Analyser®.

Para fim de análise estatística foram formados 2 grupos: Grupo 1 composto pelos dados amostrais da primeira imagem dos exames dos 157 olhos e grupo 2: composto pelos dados amostrais dos exames dos 157 olhos que consideraram o número de imagens necessárias para que o exame seja considerado completo pela análise do software Cells Analyser®, com erro relativo inferior a 5%.

Os dados das amostras serão relatados por meio de estatística descritiva. As amostras pareadas serão comparadas, pelo teste t-Student bicaudal com nível de 99% ($p < 0,01$), quanto ao número de células contadas, área endotelial avaliada e erro amostral⁽¹³⁾.

RESULTADOS

Nos 157 olhos da amostra, em 143 (91,1%) foram necessárias duas imagens com número médio de 106 células por imagem considerada, em 12 (7,6%) foram necessárias três imagens com número médio de 78 células por imagem considerada, em dois (1,3%) foram necessárias quatro imagens com número médio de 58 células por imagem considerada (Gráfico 1).

Os resultados dos dados amostrais estudados foram: 1) Número de células existentes nos exames endoteliais: no grupo 1 a média foi de 104 ± 27 células e no grupo 2 a média foi de 214 ± 54 células. A comparação da média do número de células contadas entre os grupos 1 e 2 apresentou diferença estatisticamente significativa com $p = 4 \times 10^{-24}$ (Tabela 1).

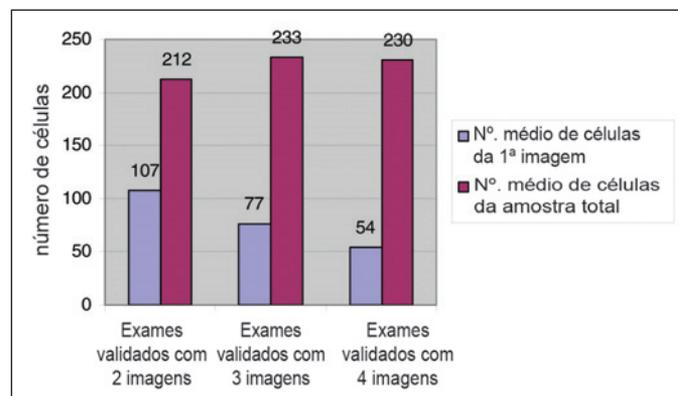


Gráfico 1 - Número de células na primeira imagem e na amostra total validados com 2, 3 ou 4 imagens (Goiânia, 2006)

Tabela 1. Análise estatística do número de células, área da amostra endotelial e erro amostral consideradas entre os grupos 1 e 2 (Brasília, 2006)

Variável	Grupo 1	Grupo 2	P bi-caudal
Número de células contadas	104 ± 27	214 ± 54	4x10 ⁻²⁴
Área da amostra endotelial (µm ²)	39.766 ± 6.743	79.805 ± 23.790	2x10 ⁻¹⁸
Erro amostral	6 ± 1,8	3,9 ± 0,56	1x10 ⁻²¹
Teste t-Student			

1) Área endotelial avaliada: no grupo 1 a média da área endotelial avaliada foi de 39.766±6.743; e no grupo 2 a média da área endotelial avaliada foi de 79.805±23.790. A comparação da área endotelial avaliada apresentou diferença estatisticamente significativa com $p= 2 \times 10^{-18}$, entre o Grupo 1 e o Grupo 2 (Tabela 1).

2) Erro amostral nos exames de microscopia especular de córnea: no grupo 1, a média do erro amostral foi de 6,0±1,80%, e no grupo 2, a média do erro amostral foi de 3,9±0,56%. A comparação entre a média do erro amostral com $p= 1 \times 10^{-21}$, entre o Grupo 1 e o Grupo 2 apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 1).

DISCUSSÃO

A escolha do tema desta pesquisa deve-se à observância, em eventos científicos e na clínica diária, de inúmeras aplicações da microscopia especular de córnea e ao interesse de se conhecer a qualidade estatística das amostras endoteliais obtidas pelo exame, considerando a inexistência de relatos científicos sobre o perfil do erro amostral no exame de microscopia especular da córnea⁽¹⁴⁻¹⁵⁾.

Com a utilização do Cells Analyzer® a maior parte dos exames realizados foram considerados incompletos, necessitando de mais de uma imagem do mosaico endotelial, para que o número de células (amostra endotelial) fosse considerado adequado. O maior número de imagens relatado no estudo foi quatro, porém caso exista maior heterogeneidade na morfologia das células endoteliais, poderá ser necessário número de imagens maior que quatro.

Nas menores densidades endoteliais as células são maiores o que determina menor número de células nas imagens dos microscópios especulares, pois a área documentada é sempre fixa e característica para cada marca de aparelho. Este é outro fator que determina a necessidade de maior número de imagens para validação do exame endotelial⁽¹⁶⁻²⁰⁾.

A idade dos pacientes cujos exames foram realizados variou da segunda à nona década de vida, evidenciando sua heterogeneidade etária. Fato que reforça a necessidade de auxílio informatizado para cálculo do tamanho amostral para a microscopia especular de córnea. Para cada década de vida existe padrão distinto de morfologia endotelial a ser considerada na determinação do tamanho da amostra de células endoteliais^(4,21-22).

O erro amostral médio existente nos exames do grupo 1, com uma única imagem, foi superior ao utilizado na maioria dos estudos realizados pela ciência médica (grau de confiança de 95% e erro relativo de 5%). Com a captação de novas imagens endoteliais, distintas das anteriores, e o aumento do número de células consideradas, foi possível validar todos os exames endoteliais realizados. Este fato demonstra que a metodologia utilizada é efetiva.

Fica evidente, a existência a diferença estatística entre os dados das amostras endoteliais dos exames de microscopia especular de córnea, quando comparadas amostras endoteliais de uma única imagem endotelial, com amostras endoteliais obtidas sob orientação de software específico, com tantas células e imagens quanto indicadas por este, pois as comparações realizadas demonstraram resultados estatisticamente inquestionáveis, pois o valor de p calculado tende a zero.

O software Cells Analyser® foi objetivo em orientar a determinação do tamanho das amostras endoteliais e calcular o erro amostral nos exames de microscopia especular. Fica evidente sua importância na rotina do exame endotelial para que se realizem exames com erro tolerável (menor que 5%), conferindo-lhes representatividade e reprodutibilidade.

Sugere-se, como forma de padronização, que o cálculo do tamanho amostral e a determinação de erro amostral sejam utilizados de forma rotineira nos serviços que dispõem de microscópio especular de córnea. Esta metodologia não deve ser empregada para exame do mosaico endotelial que apresente estruturas complexas, tais como córnea guttata, distrofia endotelial de Fuchs, distrofia polimorfa posterior e síndrome endotelial iridocorneal.

CONCLUSÃO

Comprovou-se existência de diferença estatística entre número de células contadas, a área das amostras endoteliais e o erro amostral nos exames de microscopia especular, quando comparadas amostras endoteliais de uma única imagem endotelial com amostras endoteliais obtidas sob orientação de software específico (Cells Analyser®), com tantas células e imagens quanto indicadas por este, mostrou-se estatisticamente diferente, com amostras maiores e erros amostrais menores, após a intervenção do software Cells Analyzer®; o que evidencia a importância do seu uso para se obter exames de microscopia especular de córnea com representatividade, padronização e reprodutibilidade.

ABSTRACT

Purpose: To describe differences between number of cells, evaluated endothelial area and relative error comparing endothelial samples from one endothelial image with endothelial samples obtained by guidance of a specific software, with number of cells and images as many as necessary. **Methods:** A transversal study was performed, comparing the endothelial

samples with and without intervention of the software. The sample consisted of 157 eyes. They were divided into 2 groups. Group 1 consisted of data of the first image and group 2 consisted of data from as many images as necessary for a complete examination guided by the Cells Analyser software (95% confidence interval and 0.05 relative error). The evaluated data were number of counted cells, equivalent evaluated field (mm^2) and relative error. Student's t test with 99% confidence interval ($p < 0.01$) was used. **Results:** The compared data showed statistically significant differences between groups 1 and 2 in cell count ($p = 4 \times 10^{-24}$), evaluated endothelial field ($p = 2 \times 10^{-18}$) and relative error ($p = 1 \times 10^{-21}$). **Conclusion:** The study of the sample data with or without the analysis of the software Cells Analyser® showed statistically significant differences showing clearly the importance of using it in order to obtain representative, standardized and reproducible results of specular microscopy examination.

Keywords: Endothelium, corneal; Microscopy/methods; Statistical analysis; Software; Reproducibility of results; Comparative study

REFERÊNCIAS

1. Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*. 1982;89(6):531-90.
2. Yee RW, Geroski DH, Matsuda M, Champeau EJ, Meyer LA, Edelhauser HF. Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function, and morphology in wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985;26(9):1191-201.
3. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):1754-67.
4. Abib FC, Guimarães MR. Princípios, técnicas e dados semiológicos da microscopia especular de córnea. In: Abib FC, editor. *Microscopia especular de córnea: manual e atlas*. Rio de Janeiro: Revinter-RioMed; 2000. p.19-24.
5. Phillips C, Laing R, Yee R. *Specular microscopy*. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005. p.261-81.
6. Corneal endothelial photography. Three-year revision. *American Academy of Ophthalmology. Ophthalmology*. 1997;104(8):1360-5.
7. Schor P, Chamon W. Microscopia especular corneana. *Arq Bras Oftalmol*. 1996;59(5):529-31.
8. Jackson AJ, Gardiner T, Archer DB. Morphometric analysis of corneal endothelial giant cells in normal and traumatized corneas. *Ophthalmic Physiol Opt*. 1995;15(4):305-10.
9. Siersema JV, Landesz M, van den Brom H, van Rij G. Automated video image morphometry of the corneal endothelium. *Doc Ophthalmol*. 1993;85(1):35-44.
10. Ohno K, Nelson LR, MacLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Comparison of recording systems and analysis methods in specular microscopy. *Cornea*. 1999;18(4):416-23.
11. Jurkunas U, Colby K. Evaluation of corneal endothelium. *Contemp Ophthalmol*. 2005;4(1):1-8.
12. Abib FC. *Corneal specular microscopy with statistical reliability and reproducibility*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006.
13. Berquo E, Souza JMP, Gotlieb SLD. *Bioestatística*. São Paulo: Epu; 1981.
14. Schaefer TM, Abib FC, Barreto Júnior J. Estudo da morfologia endotelial em usuários de lentes de contato acrílicas. *Arq Bras Oftalmol*. 2002;65(2):239-42.
15. Hirst LW, Ferris FL 3rd, Stark WJ, Fleishman JA. Clinical specular microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1980;19(1):2-4.
16. Doughty MJ. Concerning the symmetry of the 'hexagonal' cells of the corneal endothelium. *Exp Eye Res*. 1992;55(1):145-54.
17. Vecchi M, Braccio L, Orsoni JG. The Topcon SP 1000 and Image-NET systems. A comparison of four methods for evaluating corneal endothelial cell density. *Cornea*. 1996;15(3):271-7.
18. Geroski DH, Edelhauser HF. Morphometric analysis of the corneal endothelium. *Specular microscopy vs. alizarin red staining*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30(2):254-9.
19. Benetz BA, Diaconu E, Bowlin SJ, Oak SS, Laing RA, Lass JH. Comparison of corneal endothelial image analysis by Konan SP8000 noncontact and Bio-Optics Bambi systems. *Cornea*. 1999;18(1):67-72.
20. Price NC, Cheng H. Contact and noncontact specular microscopy. *Br J Ophthalmol*. 1981;65(8):568-74.
21. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *Ophthalmology*. 1982;89(6):525-30.
22. Laule A, Cable MK, Hoffman CE, Hanna C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol*. 1978;96(11):2031-5.

XXIX Congresso do Hospital São Geraldo

16 a 18 de outubro de 2008

Minascentro
Belo Horizonte - MG

INFORMAÇÕES

Consult Comunicação e Eventos

Tel.: (31) 3291-9899

home page: www.hospitalsaogeraldo.com.br