

Sistema de Avaliação Objetiva de Células Endoteliais de Córneas Doadas

Liliane Ventura*, Flávio Isaac*, Cesar A. C. Caetano**+, Sidney Júlio de Faria e Sousa*, Paulo E. M. Ribeiro Júnior*

*Laboratório de Física Oftálmica

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia - FMRP-USP

+ Departamento de Física e Matemática (FAMB) - FFCLRP-USP

Recebido 12 de janeiro 1999

O método óptico mais eficiente de avaliação de córneas doadas, para fornecer um laudo final sobre elas quanto ao uso em transplante, é contar o número de células endoteliais vivas existentes na mesma (pelo menos 2000 células/mm², após preservação). Microscópios Especulares são equipamentos comerciais exclusivamente dedicados a este tipo de avaliação, mas dado seu alto custo, a maioria dos Bancos de Olhos no País não possuem condições financeiras para adquiri-los. Além disso, a maioria destes microscópios proporciona imagem das células endoteliais das córneas que ainda não foram removidas do globo ocular. Outros, que proporcionam as imagens das células endoteliais da córnea já preservada, são extremamente difíceis de focalizar e desencorajam o clínico a utilizá-lo freqüentemente. Por conseguinte, a avaliação é feita habitualmente em uma Lâmpada de Fenda e apenas o aspecto das células é observado. Para superar as limitações de análise subjetiva, as dificuldades de manipulação e custo alto, desenvolvemos um sistema acoplado à Lâmpada de Fenda (magnificação de 250X da imagem das células, exibida num monitor de PC e um software dedicado para o tratamento da imagem e contagem de células) capaz de contar as células endoteliais a um baixo custo, padronizando assim, um laudo final para as córneas doadas.

The most effective optical method for evaluating donated corneas, in order to provide a diagnostic for the use of it in transplant is to count the number of the living endothelial cells (at least 2000cells/mm² after preservation). Specular Microscopes are equipments which are exclusively dedicated for this kind of evaluation. However they are of high cost and most of Eye Banks are not provided by them. Also, most of them are only able to display the image of the endothelial cells of corneas which have not yet been removed from the eyeball. Others, which provide the images of the endothelial cells of the preserved cornea, are extremely hard to focus, discouraging the clinician to use it frequently. Hence, the usual evaluation is done in a Slit Lamp and just the aspect of the cells are subjectively observed. In order to overcome the limitations of subjective assessment, the difficulties of manipulation and high cost, we have developed a system attached to the Slit Lamp (250X magnification of the image of the cells displayed on a PC monitor and a dedicated software for image treating and cells counting) which is able to count the endothelial cells providing a lower cost objective and standard diagnostic of the donated corneas.

I. Introdução

Para uma melhor compreensão da importância em se avaliar o número de células endoteliais, será feita a seguir uma breve descrição sobre a córnea humana.

I.1 A córnea Humana

A parte anterior do olho humano, de aspecto transparente, é a córnea. Ela possui, de fora para dentro, as seguintes camadas: o epitélio, o estroma e o endotélio

(veja figura 1). O **epitélio** é o revestimento externo da córnea. Funciona como uma proteção mecânica da mesma forma como a pele protege as demais regiões de nosso organismo. O estroma é a córnea propriamente dita pois corresponde a 95% da sua espessura. É constituído de tecido fibroso disposto em lamelas regulares com muito baixa hidratação e sem nenhum vaso sanguíneo. Tais características respondem por sua transparência acentuada. Finalmente, o endotélio reveste a face interna da córnea com uma camada única

de células poligonais.

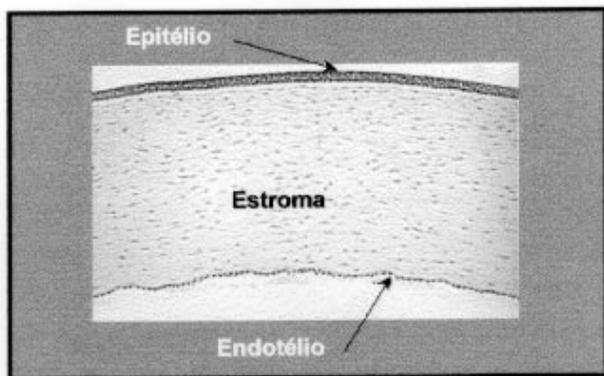


Figura 1. Esquemática das camadas da córnea.

O endotélio é particularmente importante por ser o responsável ativo pela manutenção da desidratação da córnea e, portanto, por sua transparência. O procedimento biológico é o seguinte: o humor aquoso penetra constantemente dentro da córnea impulsionado pela pressão intra-ocular. Com ele vão os alimentos necessários para o metabolismo corneano. O retorno desse líquido para dentro do olho se faz contra o gradiente pressórico através de um mecanismo ativo mediado pelas células endoteliais. Falhando essas células, a córnea incha e perde a transparência.

No controle de qualidade das córneas doadas para transplante, a análise do endotélio é, portanto, de fundamental importância. Esta análise é fator determinante para estabelecer se essa córnea tem condições de permanecer transparente no hospedeiro. Um mal endotélio exclui essa possibilidade. Uma córnea apropriada para transplante, após retirada do globo ocular e preservada, deve ter, pelo menos, 2000 células/mm². Há vários equipamentos comerciais disponíveis no mercado - Microscópios Especulares (ME) capazes de proporcionar a contagem das células endoteliais em córneas "in situ" (córneas que ainda não foram removidas do globo ocular) e há poucos deles que são adequados para contar o número de células em córneas "in vitro" (córneas removidas e preservadas em um recipiente com um líquido apropriado). É desnecessário dizer que depois que a córnea é removida do globo ocular, há uma perda significativa de células endoteliais.

Além disto, os ME possuem um elevado custo, dificultando os Bancos de Olhos de o adquirirem. Para se ter uma idéia, dos 64 Bancos de Olhos cadastrados no Brasil, apenas 2 deles possuem um ME. Conseqüentemente, a avaliação rotineira é realizada em uma

Lâmpada de Fenda (LF) - ampliação de 40X - e somente o aspecto das células é observado, tornando a análise extremamente subjetiva (a figura 2 mostra as células endoteliais com uma ampliação de 40X), impossibilitando, então, a quantificação das células. Para superar as limitações da avaliação subjetiva e o alto custo de aquisição de um ME, desenvolvemos um sistema de contagem de células endoteliais de córneas "in vitro", acoplado à LF. As LF (biomicroscópios oculares) estão disponíveis em todos os Bancos de Olhos, e são utilizadas habitualmente para vários propósitos, além de permitir observar o aspecto das células. O sistema desenvolvido está descrito a seguir.

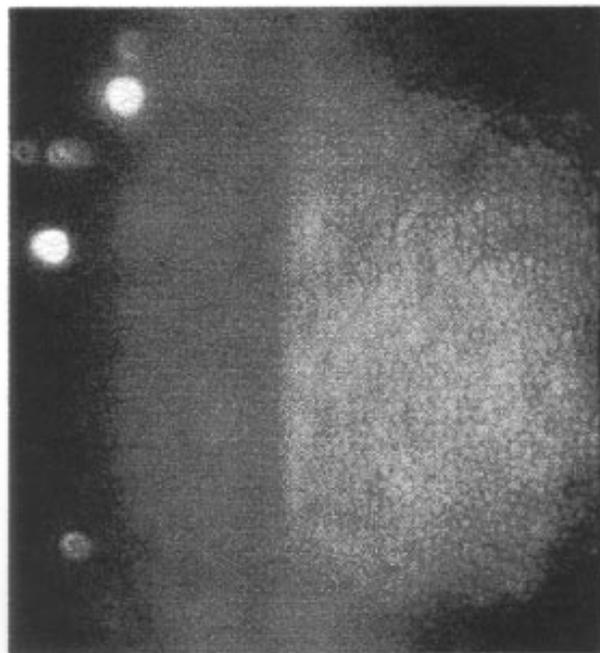


Figura 2. Células endoteliais observadas numa Lâmpada de Fenda com uma magnificação de 40X.

II. O sistema

Previamente à descrição do sistema, será feita uma breve explanação sobre o procedimento para observação da camada endotelial.

II.1 Observação das células do Endotélio^{6,7,8}

Como o endotélio é uma camada unicelular e, portanto, com espessura bastante delgada, comparada às demais camadas que compõem a córnea, é somente possível ser observado através do método denominado "reflexão especular"⁶.

A figura 3a mostra o esquema para a observação das células endoteliais. Uma fenda de luz incide na córnea,

em um ângulo ideal, que é basicamente obtuso o suficiente para proporcionar a observação das três camadas principais (epitélio, estroma e endotélio) em três planos focais diferentes e levemente desviados entre si, como mostra a figura 3b.

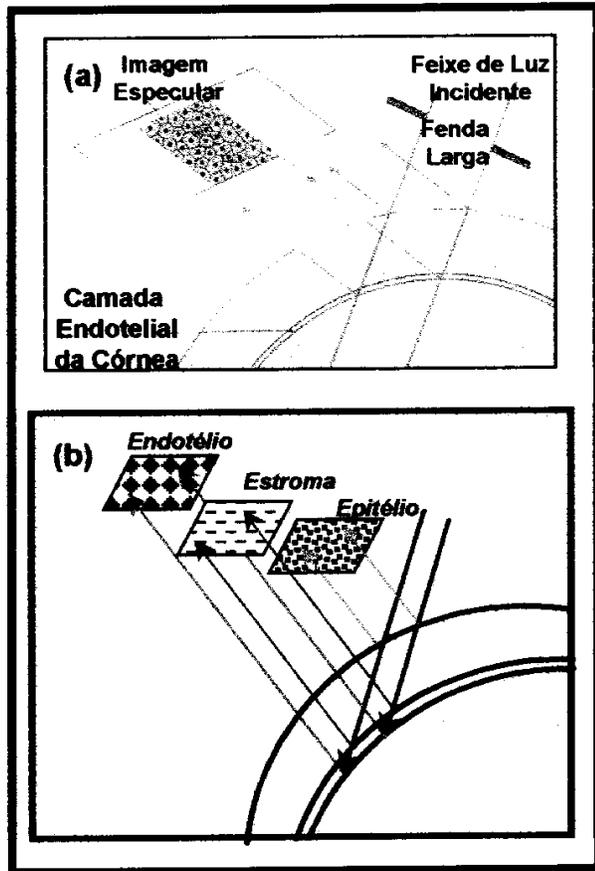


Figura 3. (a) Esquematização para a observação da camada endotelial; (b) Os planos focais das imagens das camadas da córnea.

O observador focaliza a Lâmpada de Fenda (ou biomicroscópio) no plano focal desejado, no caso, o endotélio. A luz refletida correspondente às camadas epitelial e estromal, que são de alta intensidade comparadas à do endotélio, interferem na imagem na forma de um borrão luminoso. Como podemos observar na figura 3b, os feixes de luz refletidos da camada endotelial são muito menos intensos que os do epitélio e do estroma, e esta é a razão da imagem característica das camadas da córnea, composta por três partes diferentes: uma de alta luminosidade (parte brilhante correspondente ao epitélio e estroma), outra de baixo contraste (correspondente ao endotélio), e uma terceira escura, correspondente às camadas subsequentes do olho. Na verdade, o endotélio é observado na “penumbra” da luz que atinge as outras camadas previamente. Podemos

observar uma imagem característica do endotélio corneano na figura 2.

II.2 Sistema desenvolvido

Foi desenvolvido um sistema óptico de magnificação, acoplado à LF exatamente no caminho óptico dos raios paralelos do biomicroscópio. Um conjunto de prismas (separador de feixes comercial para LF) desvia os raios para o sistema óptico desenvolvido.

Todo o sistema de microscopia especular desenvolvido para observação do endotélio, que é parte do sistema da LF, consiste de quatro partes distintas: 1. o sistema de projeção, que é a iluminação da córnea com uma luz em forma de fenda; 2. o sistema de ampliação, que magnifica a imagem o suficiente para que o observador possa distinguir o contorno das células; 3. o sistema de detecção, que exibe a imagem em um monitor de PC; 4. um “software” dedicado que processa a imagem, melhorando seu contraste e possibilitando uma boa observação para o clínico. As quatro partes são descritas em detalhes a seguir:

II.2.1 Sistema de Projeção

A córnea é iluminada pelo próprio sistema de iluminação da LF. A luz é ligada em sua potência máxima (30W) e ajustada em forma de uma fenda de 2,0mm.

II.2.2 Sistema de Magnificação

O sistema óptico desenvolvido, que proporciona uma magnificação de 250X, está detalhadamente apresentado na figura 4a e uma foto do sistema óptico está apresentada na figura 4b. Consiste de três lentes (dispostas de forma a se obter uma distância focal equivalente a 220mm de uma lente convergente), uma íris, um espelho, um tripleto (que proporciona uma ampliação de 1.6X) e um sistema de ajuste fino. Uma fenda, não mostrada na figura 4, é posicionada previamente ao sistema óptico da LF para que seja obtida uma imagem de melhor contraste do endotélio. Tal fato pode ser melhor compreendido através da figura 3b. Se uma fenda é posicionada adequadamente após a luz ser refletida da córnea, parte da luz refletida do epitélio e do estroma é evitada, proporcionando assim, uma imagem de menos brilho da camada endotelial, mas com um contorno mais definido das células, ou seja, um melhor contraste. Devemos lembrar que a fenda de luz, projetada na córnea, não é formada através de raios completamente paralelos. Eles são ligeiramente divergentes

e, após atingirem a córnea e serem refletidos (espalhados), divergem cada vez mais à medida que a distância do sistema ótico de captura aumenta. A distância entre o sistema ótico de magnificação e a córnea é de 70mm - como em nosso caso - ou 100mm, dependendo do modelo da LF. Assim, a imagem do endotélio será mais escura e de baixo contraste (interferência da luz espalhada pelas outras camadas da córnea).

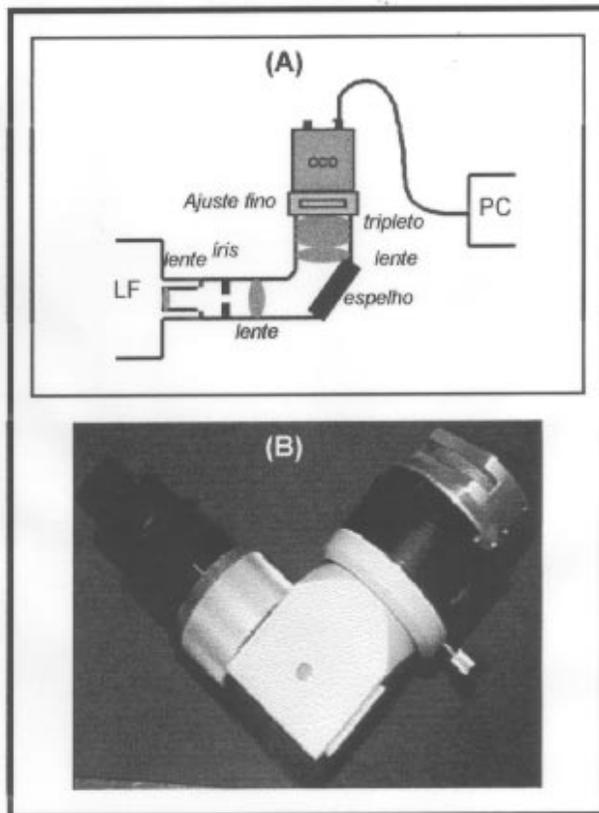


Figura 4. (a) Esquemática do sistema desenvolvido acoplado à Lampada de Fenda; (b) Foto do sistema de magnificação (250X) desenvolvido para ser acoplado à Lampada de Fenda.

Esta interferência é minimizada ao utilizarmos uma fenda no caminho ótico, após a luz ser refletida pela córnea.

A ampliação de 250X é suficiente para a clara observação das células e, portanto, para contá-las visualmente.

II.2.3 Sistema de detecção

A imagem é capturada por um detector CCD (sensibilidade de 3lux, 470TV linhas) e é exibido em um monitor de PC (Pentium 166MHz, 32MB de memória RAM) através de uma placa de captura de vídeo comercial (SE-100 da Creative).

II.2.4 Processando a imagem

A imagem fornecida pelo sistema ótico não possui bom contraste para ser exibida ao clínico (vide figura 5a). Um programa dedicado, que processa a imagem assim que ela é capturada, foi desenvolvido para exibir uma imagem nítida no que se refere ao seu contraste, brilho e definição de contorno das células (figura 5b). O tratamento da imagem é feito utilizando-se funções de morfologia matemática. Um "software" dedicado para capturar a imagem e exibí-la no monitor foi desenvolvido, utilizando-se o "software" Delphi 2.0. Além disso, foi implementado um banco de dados dedicado a Banco de Olhos nacionais. O "software" permite que clínico possa contar interativamente o número de células/mm² do endotélio.

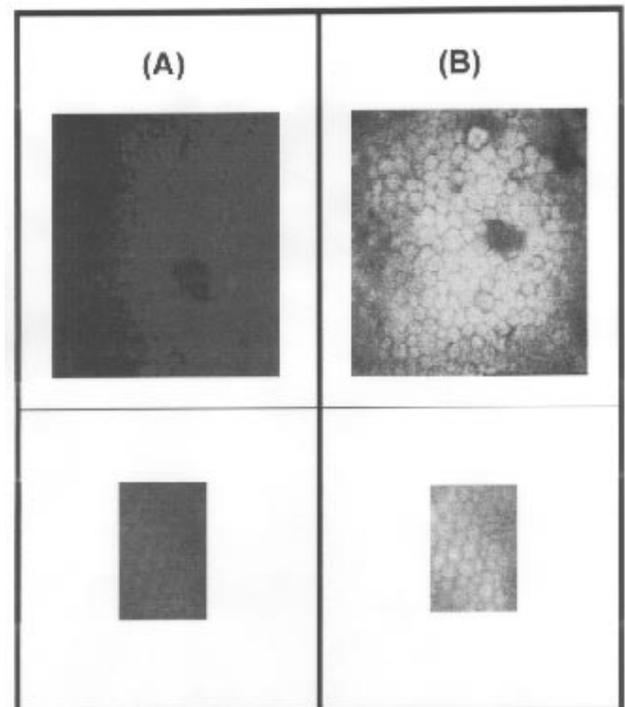


Figura 5. (a) Imagens do endotélio observadas previamente aos seus processamentos (no monitor, as imagens apresentam um contraste um pouco melhor do que o impresso, permitindo uma certa visualização ao clínico); (b) Imagem do endotélio processada. As imagens à direita correspondem às imagens à esquerda processadas.

III. Resultados

No sistema desenvolvido, o endotélio córneoano é observado em seu meio de preservação (em Optisol ou Likorol). O sistema é ajustado de modo que o médico possa focalizar as células da córnea pelo monitor ou pelas lentes oculares da LF.

A figura 6 mostra uma foto do sistema. A córnea preservada pode ser avaliada, previamente ao transplante, em quaisquer das duas câmaras úmidas disponíveis no mercado: um recipiente de acrílico que contém o líquido para a preservação e que permite que a córnea possa ser examinada na posição vertical, ou em um recipiente de vidro, com o líquido de preservação, onde a córnea fica na posição horizontal (a maioria dos Bancos de Olhos do País utiliza este recipiente). Para isto é necessário utilizar um espelho de alta reflexão (90% de reflexão para a luz branca) a 45° para se poder examinar a córnea (vide figura 6). No recipiente de vidro⁷ a qualidade de imagem é mais pobre, uma vez que há uma perda de 10% da luz refletida da córnea ao atingir o espelho. Porém, muitos dos Bancos de Olhos ainda usam este tipo de câmara úmida por várias razões, mas que não são importantes para descrever neste momento.



Figura 6. Foto do sistema desenvolvido. Uma córnea preservada está sendo avaliada previamente ao transplante.

Para se obter algumas informações quantitativas sobre as células endoteliais, foi desenvolvido um *software* dedicado que possui as seguintes características (figura 7):

1. Janela para exibir a imagem (baixo contraste) em tempo real, em uma tela que possui todos os dados prévios da córnea a ser analisada (data do óbito, causas da morte, número do doador, resultado do exame de sangue do doador, aspectos gerais da córnea, etc). Após um quadro da imagem ser capturado, a imagem é processada de forma a apresentar melhor contraste e nitidez.

2. Após capturada a imagem, o médico seleciona com o “mouse” uma região da imagem (desenhando um quadrado ou desenhando qualquer outra forma) e marca as células internas utilizando o botão esquerdo do “mouse” (ao redor 20 células). Então, o “software” calcula o número de células endoteliais por mm^2 na córnea;

3. A córnea pode ser analisada em várias partes e um valor médio é apresentado. A figura 7 mostra dois quadros do “software”. Não há nada novo sobre o procedimento de contagem interativa das células do endotélio (desenhando uma janela e marcando as células internas a esta janela utilizando o “mouse”) disponível no mercado. No entanto, este sistema possibilita capturar uma imagem de partes diferentes da córnea e fazer uma média das células contadas, o que é um fator muito importante na indicação da córnea para o transplante. Além disso, em todos os sistemas disponíveis no mercado, apenas a região central da córnea pode ser avaliada, enquanto em nosso sistema não há nenhum limite do número de regiões da córnea para ser examinado; depende exclusivamente do tempo disponível do clínico para avaliar todas as regiões da córnea. O sistema e o método de contagem interativo já estão sendo utilizados em um Banco de Olhos de um hospital público nacional.

Contagem Interativa

O sistema foi calibrado com um retículo de precisão de imagens de quadrados de $50\mu\text{m}$ de largura.

A contagem interativa das células da região central da córnea (para que pudesse realizar a comparação com um sistema comercial) foi realizada em 15 córneas doadas, em nosso sistema e num sistema comercial (Microscópio Especular da BioOptics - modelo LS2001). Os resultados da contagem dos dois sistemas estavam bastante de acordo (diferença de 5%) e a diferença obtida nas contagens estão dentro dos limites aceitáveis para um laudo final quanto à indicação ao transplante.

Contagem Média

Uma das importantes características de nosso sistema é a possibilidade da contagem das células em várias regiões da córnea.

Quanto maior o número de partes da córnea avaliado, melhor é a precisão do número de células contadas. Várias córneas foram testadas e há uma diferença de 20% entre o número de células contadas apenas na região central e a média das contadas em três regiões. Esta variação é muito importante para baixas densidades de células endoteliais. Mesmo realizando a contagem em várias regiões da córnea, há a imprecisão inerente do sistema (relativamente à ótica e aos métodos utilizados para calibração para se obter a relação do número de pixels e a dimensão em mm), que é de aproximadamente 5%. Porém esta imprecisão está dentro dos limites para este tipo de avaliação.

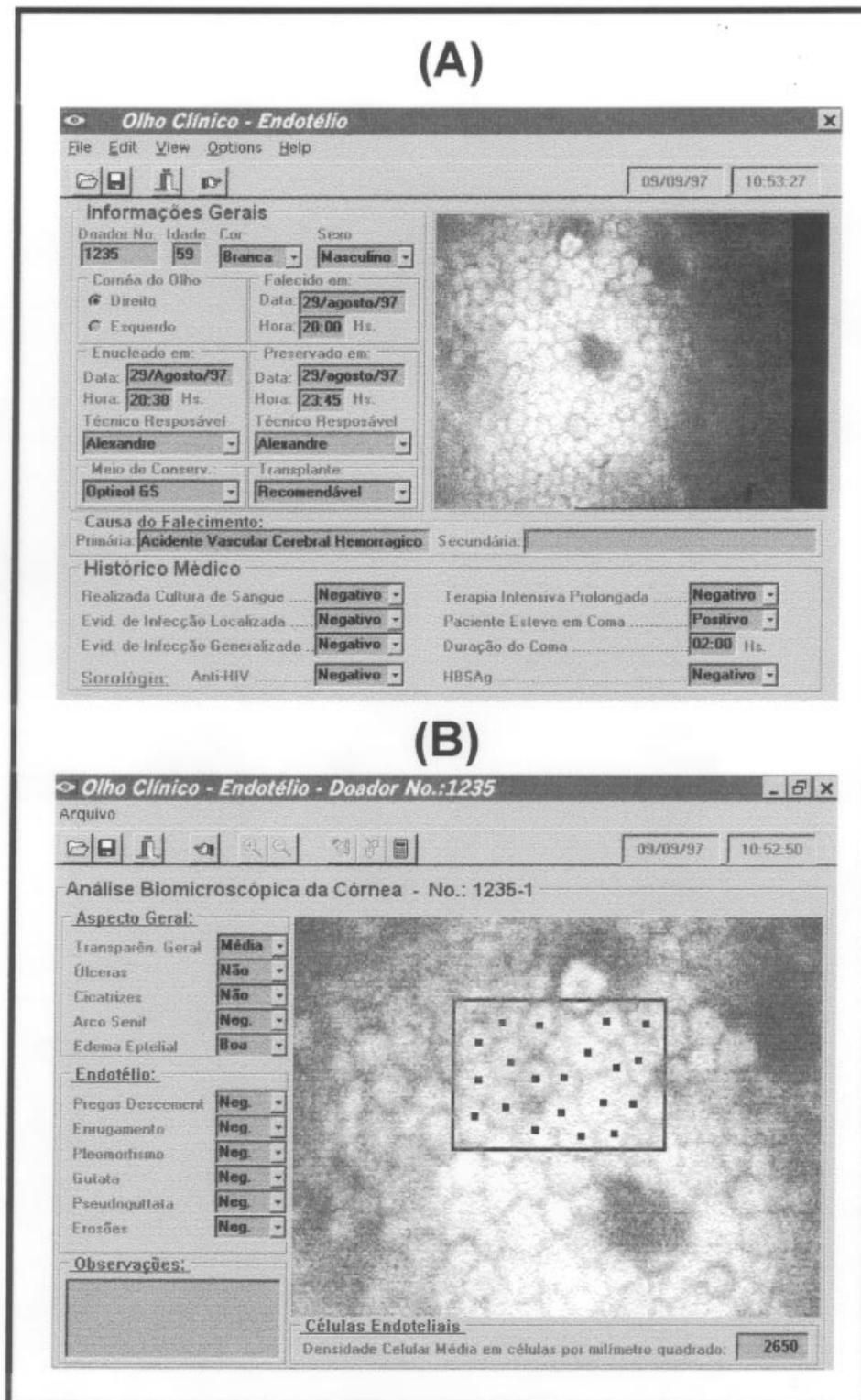


Figura 7. O “software” e algumas de suas características: (a) Informações gerais do doador e janela para captura da imagem; (b) Análise biomicroscópica da córnea.

IV. Conclusões

O sistema desenvolvido é de fácil operação e foi testado por todos os funcionários do Banco de Olhos do

Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Desde que todos Bancos de Olhos possuam uma LF (um dos equipamentos exigidos por lei para os Bancos de Olhos bra-

sileiros) e um PC (Pentium 166MHz, 32MB RAM) que normalmente é de fácil acesso e já se encontra disponível na maioria deles, o custo do sistema é baixo (70% mais barato que um ME não incluindo a LF, e 45% mais barato que o ME incluindo a LF). A LF é de fácil operação, uma vez que os clínicos a utilizam rotineiramente para muitos outros exames e, portanto, a avaliação do endotélio em LF, para estes profissionais, é bastante simples.

Os aspectos mais importantes do sistema desenvolvido são: proporcionar uma avaliação quantitativa em várias regiões da córnea, ao invés de apenas se avaliar sua região central; possibilidade de avaliação dinâmica da córnea (ou seja, o movimento da luz sobre a córnea pode ser observado em tempo real no monitor e que nenhum dos ME comerciais possuem - a imagem destes é sempre estática), o que proporciona melhor avaliação dos "snail tracks" (pregas formadas na córnea durante sua retirada) no sentido de se verificar se ainda existem células vivas; fácil manuseio, uma vez que os clínicos dos Bancos de Olhos estão habituados a manipular a LF; preço mais acessível aos Bancos de Olhos. Todos estes benefícios são proporcionados pelas características de LF (há alguns sistemas no mercado para observação do endotélio, acoplados à LF, que são específicos para avaliação subjetiva e não proporcionam magnificação da imagem maior do que 100X, tornando inviável sua contagem).

Os bons resultados obtidos têm permitido fornecer um diagnóstico padronizado para as córneas doadas. Com a implementação do sistema, algumas das córneas que normalmente eram rejeitadas por cuidado excessivo (ou inexperiência do clínico) no Banco de Olhos estão sendo agora utilizadas e, como resultado, mais córneas estão disponíveis para pacientes. Também, nos próximos anos, dados estarão disponíveis relativos ao sucesso de transplantes como uma função de uma avaliação objetiva do endotélio.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à FAPESP (proc. n^o: 95/9702-8) o apoio financeiro para esta pesquisa e para alguns dos pesquisadores, ao Banco de Olhos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, que é o Banco de Olhos que tem contribuído para o sucesso de nossas pesquisas, particularmente Stella Barreto, Alexandre da Silva Roque e Cláudio J. Cardoso de Sá e também ao CNPq e CAPES que têm apoiado nossos pesquisadores.

Referências

1. M.J. Hogan, J.A. Alvarado, E. Weddell, *Histology of the Human Eye*, (Philadelphia, WB Saunders, 1971).
2. N.C. Price and H. Cheng, "Contact and Non contact Specular Microscopy", *British Journal of Ophthalmology*, **65**, 568 (1981).
3. W.M. Bourne and H.E. Kaufman, "Specular Microscopy of Human corneal Endothelium in Vivo", *American Journal of Ophthalmology*, **81**, 319 (1976).
4. E.S. Sherrard and R.J. Buckley, "New Application of The corneal Specular Microscope", *Arch Ophthalmol* **100**, 296 (1982).
5. C.W. Roberts and C. J. Koester, "Video with Wide-field Specular Microscopy" *American Academy of Ophthalmology* **88**, 146 (1981).
6. R.A. Laing, M.M. Sandstrom, H.M. Leibowitz, "Clinical Specular Microscopy", *Arch. Ophthalmol.*, **97**, 1714 (1979).
7. R.A. Laing, M.M. Sandstrom, H.M. Leibowitz, "Clinical Specular Microscopy II. Quantitative Evaluation of corneal Endothelial Photomicrographs", *Arch. Ophthalmol.* **97**, 1720 (1979).
8. G.D. Sturrock, E.S. Sherrard, N.S. Rice, "Specular Microscopy of the corneal Endothelium", *British Journal of Ophthalmology*, **62**, 809 (1978).