

Maria João Capelo Quadrado

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, área de especialização de Cirurgia/Oftalmologia.

2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria João Capelo Quadrado

Avaliação Microestrutural da Córnea por Microscopia Confocal *in vivo*



Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, área de especialização de Cirurgia/Oftalmologia.

Coimbra 2013

Este trabalho foi realizado no IBILI – Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e no Serviço de Oftalmologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, sob a supervisão científica do Prof. Doutor Joaquim Neto Murta e do Prof. Doutor António Miguel Morgado.

AGRADECIMENTOS

A lista de todos aqueles que me ajudaram não poderia deixar de ser longa. Agradeço a todos a paciência e o incentivo para transpor o desânimo que me acompanhou em muitos momentos.

Ao Professor Doutor José Guilherme da Cunha Vaz, meu professor, meu mestre, meu formador como investigadora e oftalmologista.

Ao Professor Doutor Joaquim Neto Murta, meu orientador, meu impulsionador, meu amigo e meu director.

Ao Professor Doutor Miguel Morgado, meu orientador, meu impulsionador, meu amigo, meu revisor e meu crítico.

Ao Professor Doutor Jaap vanBest, meu orientador e meu amigo.

À Professora Linda Müller minha orientadora e colaboradora.

À Doutora Monika Popper minha amiga e companheira de trabalho.

E não posso terminar sem referir todos aqueles que me ajudaram para que eu pudesse ter tempo para realizar este trabalho.

RESUMO

O conhecimento da microanatomia da córnea é essencial para entendimento da patologia corneana, uma vez que a organização da matriz extracelular e das células é o factor mais determinante das suas propriedades ópticas e mecânicas. O conhecimento da complexidade da microanatomia da córnea requer a utilização de diversos métodos. A microscopia confocal *in vivo* da córnea é um método rápido e fidedigno de avaliação da microestrutura corneana *in vivo*. Neste trabalho, demonstrámos que, sendo um método não invasivo com resultados em tempo real, permite-nos avaliações quantitativas a nível histológico dos diferentes componentes celulares corneanos, quer na córnea normal quer na córnea com patologia.

Desde os nossos primeiros trabalhos em 2001, com o microscópio confocal Tomey ConfoScan P4, que ponderámos o imenso potencial das imagens obtidas e desde logo procurámos saber se a microscopia confocal da córnea *in vivo* poderia observar as estruturas corneanas em tempo real e com detalhe histológico.

Numa primeira fase quantificámos elementos celulares e nervos corneanos e validámos os resultados, de acordo metodologias bem precisas e que documentámos. Nestes estudos comparámos os resultados obtidos em imagens de microscopia confocal da córnea *in vivo* de botões corneanos de cadáver com as imagens histológicas dos mesmos botões que entretanto haviam sido corados com hematoxilina-eosina e verificámos a correspondência das densidades celulares calculadas nas seis camadas corneanas. Para avaliação da precisão da técnica, determinámos as repetibilidades intra-sessão e inter-sessão. Realizámos ainda um estudo comparativo das densidades celulares de diferentes camadas da córnea entre diabéticos e controlos saudáveis. Neste estudo demonstrámos que, nos diabéticos, a densidade de células basais epiteliais é significativamente inferior à observada nos indivíduos saudáveis, o que pode contribuir de uma forma significativa para o surgimento da queratopatia diabética.

Uma vez demonstrada a exactidão, a precisão e capacidade e observação fidedigna da microanatomia corneana, aplicámos a microscopia confocal da córnea no estudo clínico de diferentes patologias como a queratite por acantamoeba, insuficiência límbica, PAF tipo 1 autotransplante de conjuntiva, transplantes de córnea, cirurgia refractiva, cistinose entre outras. Confirmou-se que a microscopia confocal da córnea *in vivo* é um auxiliar valioso no diagnóstico precoce na queratite por acantamoeba. Quantificámos palissadas de Vogt na

insuficiência límbica e obtivemos imagens compatíveis com as criptas límbicas e as projecções focais estromais, tanto na microscopia confocal da córnea *in vivo* como na histologia. Tal permitiu-nos assegurar que não ocorre falência límbica na zona dadora quando realizamos autotransplante límbico para o tratamento do *pterygium*. Quantificámos os cristais de cistina na córnea de doentes com cistinose e concluímos que o tratamento com colírio de cesteamina é eficaz nestes doentes. Desta forma, verificámos a capacidade da microscopia confocal da córnea para avaliar a eficácia de terapias ao longo do tempo, algo que só é possível devido à reprodutibilidade da técnica.

Assim, os estudos que realizámos, demonstraram que a microscopia confocal da córnea permite visualizar e quantificar *in vivo* os elementos da microanatomia corneana, com exactidão validada pela histologia e de forma reprodutível, permitindo avaliações prospectivas.

ABSTRACT

The cornea microanatomy knowledge is essential to understand corneal pathology, since the organization of the extracellular matrix and cells is the most crucial factor of its optical and mechanical properties. Understanding the complexity of the corneal microanatomy requires the use of several methods. *In vivo* corneal confocal microscopy is a rapid and reliable assessment of the corneal microstructure *in vivo*. In this work we demonstrated that, being a non-invasive method with real-time results, it allows us histological quantitative evaluations of the different corneal cellular components, either in the normal or in the diseased cornea.

Since our first work in 2001, with the Tomey ConfoScan P4 confocal microscope, we understood the enormous potential of the images we could obtain and immediately tried to find out if *in vivo* corneal confocal microscopy could analyze the corneal structures in real time and with histological detail.

Initially we quantified the cellular elements and corneal nerves and we validated the results obtained according to very precise methodologies, which we documented. In these studies we compared the results obtained by *in vivo* corneal confocal microscopy images of cadaver corneal buttons to histological images of the same buttons stained with hematoxylin-eosin and found correspondence of the cell densities in six corneal layers. To evaluate the accuracy of the technique, we determined the intra and inter-session repeatabilities. We still performed a comparative study of the cellular densities of the different corneal layers in diabetic patients and healthy controls. In this study we showed that in diabetic patients the density of epithelial basal cells is significantly lower than in healthy subjects which may well contribute to the emergence of diabetic keratopathy.

Once we demonstrated the accuracy, precision, capacity and reliable observation of the corneal microanatomy, we used the corneal confocal microscopy in the clinical study of different pathologies such as acanthamoeba keratitis, limbal stem cell deficiency, PAF type 1, conjunctival autograft, corneal transplant, refractive surgery, cystinosis, among others.

We confirmed that *in vivo* corneal confocal microscopy is a valuable tool in the acanthamoeba keratitis early diagnosis. We quantified palisades of Vogt in limbal failure and obtained images compatible with limbal crypts and focal stromal projections either in *in vivo* corneal confocal microscopy or in histology.

This allowed us to ensure that no limbal stem cell deficiency occurs in the donor area when we perform the limbal auto graft for the treatment of pterygium. We quantified the cystine crystals in the cornea of cystinosis patients and concluded that the treatment with cysteamine eyedrops is effective in these patients. Thus we verified the ability of *in vivo* corneal confocal microscopy to evaluate the efficacy of therapies over time, which is only possible due to the technique reproducibility.

Thus, the studies we have performed, demonstrate that corneal confocal microscopy allows to visualize and quantify *in vivo* the elements of corneal microanatomy, with accuracy validated by histology and in a reproducible manner, allowing prospective evaluations.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Objectivos	3
1.2.	Estrutura da tese	5
2.	MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA <i>IN VIVO</i>	7
2.1.	HISTÓRIA, PRINCÍPIOS E INSTRUMENTAÇÃO	9
2.2.	CÓRNEA E PATOLOGIAS ESTUDADAS	17
2.2.1.	Anatomia da córnea	17
2.2.2.	Diabetes e Córnea	28
2.2.3.	Cistinose e Córnea	32
2.2.4.	Insuficiência Lábica	33
2.3.	IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL <i>IN VIVO</i>	39
2.3.1.	Córnea Normal	39
2.3.2.	Aplicação na Clínica	44
2.4.	QUANTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS CORNEANAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL	53
3.	ESTUDOS PUBLICADOS	63
4.	DISCUSSÃO	103
5.	CONCLUSÕES	135
	REFERÊNCIAS	139
	PUBLICAÇÕES E CITAÇÕES	163

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 2.1 - Princípio da microscopia confocal.	10
Figura 2.2 - Arranjo óptico de um <i>Tandem Scanning Confocal Microscope</i> . Adaptado de (Furrer, 2010)	11
Figura 2.3 - Arranjo óptico de um <i>Scanning-Slit Confocal Microscope</i> . Adaptado de http://www.nidektechnologies.it (consultado em 29.01.13)	14
Figura 2.4 - Microscópio confocal da córnea de varrimento laser: (a) Arranjo óptico. Adaptado de (Guthoff, 2006); (b): Heidelberg Retina Tomograph HRT II associado ao Rostock Cornea Module. CRIO - CHUC.	15
Figura 2.5 - Microscópio Confocal Tomey Confoscan P4. CRIO – CHUC e IBILI	16
Figura 2.6 – Camadas corneanas: (a) esquema que representa a divisão das diferentes camadas corneanas; (b) secção histológica em que se visualizam estas camadas.	18
Figura 2.7 – Palissadas de Vogt: (a) Biomicroscopia do limbo corneano de botão de dador cadáver do Banco de Olhos do CRIO – CHUC; (b) imagem histológica (HE; 10x) do limbo corneano de botão de dador cadáver (Laboratório de Patologia Ocular, CRIO – CHUC) onde são visíveis melanócitos na camada basal do epitélio límbico.	34
Figura 2.8 – Insuficiência límbica em doente com aniridia: (a) iluminação difusa; (b) retroiluminação. Visível a neovascularização da córnea e a opacidade central. Imagens de doente observado na Secção de Córnea do CRIO – CHUC	36
Figura 2.9 – Transplante autólogo limbo-conjuntival em doente que apresentava pterigium grau III. As imagens foram obtidas 9 meses após a cirurgia: (a) zona dadora na região límbica temporal superior sem insuficiência límbica; (b) zona de excisão do pterigium sem recidiva. CRIO – CHUC.	37
Figura 2.10 – Epitélio corneano: (a) células epiteliais superficiais; (b) células epiteliais basais. Imagens obtidas com um microscópio confocal de varrimento laser (HRT II + RCM), CRIO – CHUC.	40
Figura 2.11 – Nervos corneanos: (a) plexo nervoso sub-basal; (b) nervo corneano com bifurcação em Y no estroma médio; (c) bifurcações em H em nervos do plexo subbasal. CRIO – CHUC.	41
Figura 2.12 – Estroma corneano e queratócitos: (a) estroma anterior; (b) estroma posterior. CRIO – CHUC.	43
Figura 2.13 – Endotélio corneano. CRIO – CHUC.	44
Figura 2.14 – <i>Guttatas</i> na distrofia de Fuchs. CRIO – CHUC.	45
Figura 2.15 – Síndrome de olho seco: (a) metaplasia corneana. observa-se aumento do tamanho celular, activação nuclear e diminuição do relação núcleo/citoplasma; (b) tortuosidade anormal dos nervos corneanos; (c) neovasos. CRIO – CHUC.	46
Figura 2.16 - Queratopatia induzida pela amiodarona estadio 3: (a) nervos estromais com morfologia irregular; (b) epitélio basal com depósitos intracelulares brilhantes, hiper-reflectivos. CRIO – CHUC.	47
Figura 2.17 - Cristais de cistina no estroma anterior da córnea. CRIO – CHUC.	47
Figura 2.18 – LASIK: (a) exame de biomicroscopia em que se visualizam partículas na interface do lenticulo; (b) exame de microscopia confocal aos 8 dias e (c) aos 3 meses. CRIO – CHUC.	47

Figura 2.19 – Queratite lamelar difusa estadio 3: (a) exame de biomicroscopia; (b) exame de microscopia confocal em que se visualizam células redondas/ovais e núcleos excêntricos híper-reflectivos. CRIO – CHUC.	48
Figura 2.20 - Queratoplastia penetrante: no terceiro dia de pós-operatório podemos observar (a) queratócitos activados e (b) <i>haze</i> acentuado. Aos 3 meses podemos observar ainda um padrão em favo de mel (c). CRIO - CHUC	49
Figura 2.21 - Regeneração dos nervos corneanos sete anos após queratoplastia penetrante: (a) fibra nervosa fina; (b) e (c) fibras com tortuosidade aumentada. CRIO – CHUC.	49
Figura 2.22 - <i>Crosslinking</i> da Córnea: (a) no primeiro mês observa-se diminuição da densidade dos queratócitos e edema; (b) aos 3 meses verifica-se o início da repopulação do estroma pelos queratócitos e <i>haze</i> sub-clínico; (c) aos 6 meses a densidade de queratócitos é normal, embora se observem ainda alguns queratócitos activados. CRIO – CHUC.	49
Figura 2.23 – (a) anéis intraestromais aos 8 meses de pós operatório; (b) a MCC demonstra a presença depósitos no canal do anel e no estroma circundante. CRIO - CHUC	51
Figura 2.24 - Queratite por Acanthamoeba: (a) imagem de biomicroscopia mostrando o infiltrado estromal em anel; (b) – queratonevrite radiária e células dendríticas; (c) quistos no estroma anterior. CRIO – CHUC.	52
Figura 2.25 - Queratite fúngica: (a) biomicroscopia; (b) hifas, filamentos hipereflectivos com 4-8 μm de espessura; (c) hifas. CRIO – CHUC.	53

SIGLAS E ABREVIATURAS

AGES	<i>Advanced Glycation End-Product</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ARVO	The Association for Research in Vision and Ophthalmology
ATP	Adenosina Trifosfato
AV	Acuidade Visual
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CGTF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CLAU	<i>Conjunctival Limbal Autograft</i>
CRIO	Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia
CXL	<i>Collagen Cross-Linking</i>
DP	Desvio Padrão
ECM	Matriz Extracelular/ Extracellular Matrix
ETDRS	Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study
FDA	Food and Drug Administration
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada A1c
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HRC	<i>Highly Reflective Cells</i>
HRT	<i>Heidelberg Retina Tomograph</i>
IBILI	Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem
IVCM	Microscopia Confocal <i>in vivo</i>
LSCM	<i>Laser Scanning Confocal Microscope</i>
LASIK	<i>Laser-Assisted in Situ Keratomileusis</i>
MCC	Microscopia Confocal da Córnea
MDD	Mínima Diferença Detectável/Minimum Detectable Difference
MMP	Metaloproteinase da matriz
MO	Microscópio óptico
N _A	Densidade numérica por unidade de área
N _V	Densidade numérica por unidade de volume
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
OCT	Tomografia de Coerência Óptica

PAF	Polineuropatia Amiloidótica Familiar
QP	Queratoplastia Penetrante
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
PRK	<i>Photorefractive keratectomy</i>
PSF	<i>Point Spread Function</i>
RCM	<i>Rostock Corneal Module</i>
RD	Retinopatía Diabética
SSCM	<i>Scanning-Slit Confocal Microscope</i>
TSCM	<i>Tandem Scanning Confocal Microscope</i>
UV	ultravioleta
UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
mm	milímetro
nm	nanómetros
μm	micrómetros

1. INTRODUÇÃO

1.1. Objectivos

O conhecimento da microanatomia da córnea é essencial para entendimento da patologia corneana, uma vez que a organização da matriz extracelular e das células é o factor mais determinante das suas propriedades ópticas e mecânicas. Antes do aparecimento da microscopia confocal da córnea (MCC), o clínico tinha poucas ferramentas para avaliar *in vivo* a microanatomia corneana: a biomicroscopia é muito limitada em resolução espacial e a microscopia especular permite apenas a observação das camadas epitelial e endotelial. Com a MCC, os clínicos passaram a dispor de um método rápido com resolução espacial e contraste adequados para avaliar a microestrutura de todas as camadas da córnea humana.

Face a este potencial havia que demonstrar se a MCC era capaz de obter medidas quantitativas de densidades celulares, em todas as camadas da córnea, exactas e reprodutíveis e se equivalia aos resultados do exame histológico no estudo da córnea normal e com patologia.

Assim, as questões que pretendemos responder com este estudo foram:

1 - Pode a Microscopia Confocal da Córnea ser utilizada para quantificar estruturas celulares das diferentes camadas da córnea, de forma exacta e reprodutível, em olhos normais e com patologia?

Para responder a esta questão:

- desenvolvemos métodos que permitem quantificar a densidade das diferentes células em cada uma das diferentes camadas corneanas
- validámos a exactidão destes métodos por comparação com medidas obtidas em exames histológicos
- avaliámos a precisão dos métodos com a determinação das repetibilidades intra e inter-sessão
- aplicámos a nossa metodologia na avaliação de córneas normais e córneas de doentes portadores de diabetes.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

2 - Pode a Microscopia Confocal da Córnea ser utilizada para observar em doentes, em tempo real, estruturas com detalhe histológico?

Para responder a esta questão:

- efectuámos um estudo laboratorial para avaliação das palissadas de Vogt a nível límbico, em que comparámos os achados da Microscopia Confocal da Córnea em botões corneanos de cadáver com os correspondentes achados histológicos, para verificar a correspondência do tipo de estruturas observadas e a sua localização
- incluímos ainda um caso clínico de cistinose que demonstra de forma clara a utilidade e importância da MCC para o seguimento de uma patologia, com base na avaliação das microestruturas da córnea, sem recorrer a exames histológicos.

1.2. Estrutura da tese

Este trabalho organiza-se em torno de três partes fundamentais. Na **primeira parte**, denominada Introdução, apresentam-se os objectivos do trabalho e efectua-se uma actualização sobre a MCC, quer em termos de evolução histórica, quer em termos de descrição da microestrutura da córnea.

Na **segunda parte** são apresentados os artigos publicados e que suportam o trabalho científico. Realizámos um estudo experimental em que desenvolvemos e validámos uma metodologia para medição *in vivo* das densidades celulares em todas as camadas corneanas. No segundo estudo, aplicámos esta metodologia em córneas diabéticas de indivíduos com retinopatia grau 20 na escala ETDRS, tendo encontrado alterações estruturais nestas córneas. Posteriormente, realizámos três estudos em patologias da nossa actividade clínica regular (um estudo na cistinose e dois estudos na insuficiência límbica) em que demonstrámos a capacidade da MCC para a avaliação microestrutural da córnea e o impacto desta capacidade no diagnóstico, no planeamento e na avaliação terapêutica.

Na **terceira parte** efectua-se uma discussão dos resultados dos nossos estudos, em que procuramos transpor esses resultados para a nossa actividade clínica.

Por último, incluímos as conclusões finais da nossa dissertação.

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

2.1. HISTÓRIA, PRINCÍPIOS E INSTRUMENTAÇÃO

As técnicas de imagem do globo ocular são fundamentais para melhorar a capacidade de diagnóstico, avaliar o grau e a progressão da doença e assim melhorar o tratamento desta. A biomicroscopia é o exame fundamental na observação clínica dos doentes com patologia oftalmológica. No entanto, esta técnica apresenta uma capacidade limitada de resolução e ampliação das estruturas (aproximadamente 40 vezes), pelo que se tornou necessário o desenvolvimento de técnicas mais diferenciadas, de forma a permitir que o exame clínico fosse complementado com observações *in vivo* das microestruturas celulares. A Microscopia Confocal da Córnea (MCC) adquiriu especial relevância pela capacidade de produzir imagens de cada uma das camadas corneanas, em tempo real, *in vivo* e com elevada resolução lateral e axial. A MCC permite-nos a identificação de estruturas celulares e subcelulares sem depender das técnicas de histologia convencional da córnea (Cavanagh, 1993; Bohnke, 1999; Jalbert, 2003; Erie, 2009; Guthoff, 2009; Nubile, 2009).

A microscopia óptica convencional baseia-se na fixação, processamento, corte e coloração dos tecidos implicando a destruição das células e oferece uma imagem estática e bidimensional de um tecido tridimensional com uma resolução lateral que pode ser inferior a 0.5 μm (Pawley, 2002). Por resolução lateral entende-se a menor distância entre dois pontos distinguíveis, situados no mesmo plano focal do objecto. Nos últimos 50 anos ocorreram vários desenvolvimentos com o objectivo de permitir a observação *in situ* e *in vivo* de células em tecidos tridimensionais, tendo alguns destes desenvolvimentos encontrado aplicação na clínica oftalmológica. Em 1968, Maurice (Maurice, 1968) introduziu o microscópio especular em que células vivas podiam ser fotografadas *in situ*. As adaptações ao microscópio especular de Maurice efectuadas por Laing (Laing, 1975) permitiram as primeiras fotografias do endotélio corneano *in vivo*. Modificações posteriores efectuadas por Bourne e Kaufman (Bourne, 1976) tornaram possível que este microscópio fosse utilizado para a observação clínica e com capacidade de fotografar o endotélio corneano com elevada ampliação (200x). Embora este microscópio seja útil para a observação *in vivo* do endotélio corneano,

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

não permite a visualização fácil das outras camadas corneanas nomeadamente do epitélio e dos queratócitos do estroma.

A capacidade de visualizar *in vivo* diferentes camadas de um tecido espesso, normalmente designada por secçãoamento óptico, implicou a adopção de arranjos ópticos confocais. Um sistema óptico confocal caracteriza-se pela utilização de um sistema de iluminação que ilumina apenas um ponto do campo de visão do microscópio e pela existência de um filtro espacial na óptica de detecção, colocado num plano conjugado¹ do plano do focal de iluminação. Por filtro espacial designamos uma fenda ou um orifício que bloqueia mecanicamente qualquer luz proveniente de planos da amostra que não o plano focal de iluminação. Na microscopia convencional todos os pontos do objecto são iluminados simultaneamente e a imagem é também obtida simultaneamente de todos os pontos. A utilização do princípio confocal, ilustrado na Figura 2.1, implica que os diferentes pontos do objecto sejam iluminados sequencialmente, com as respectivas imagens obtidas também sequencialmente. Tal só é possível com a utilização de sistemas de varrimento que garantam que os focos dos sistemas de iluminação e detecção se desloquem ao longo da região do tecido que se pretende visualizar. Embora isto se possa conseguir quer movendo o tecido e mantendo fixa as ópticas de iluminação e de detecção, quer mantendo o tecido estacionário e movimentando os sistemas de iluminação e detecção, só esta última opção é aplicável à microscopia *in vivo* de tecidos corneanos.

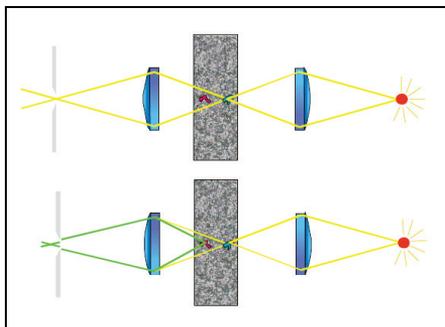


Figura 2.1 - Princípio da microscopia confocal.

¹ Em óptica diz-se que dois planos são conjugados quando um dos planos contém todos os pontos imagem do outro plano, considerado como constituído por pontos objecto.

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

Na sequência da invenção do Microscópio Confocal por Marvin Minsky em 1957 (Minsky, 1961), Petran e Hadravsky desenvolveram um método inovador de microscopia confocal (Petran, 1985) em que o varrimento óptico do tecido era implementado por um disco de Nipkow. Trata-se de um disco com um número elevado de orifícios, organizados em espirais de Arquimedes, inserido no sistema óptico de modo a que cada orifício tenha um par conjugado. Desta forma, a rotação do disco assegurava que quer o sistema de iluminação quer o sistema de deteção varriam o tecido.

A evolução desta nova tecnologia de forma a permitir a utilização *in vivo*, implicou obter soluções para os problemas colocados pelos níveis inadequados de luz para aquisição de imagens e pelo movimento involuntário dos doentes durante a observação. Estes movimentos dos doentes secundários à pulsação, à respiração e às microssacadas oculares obrigaram ao desenvolvimento de sistemas de captura rápida das imagens, com tempos de exposição por imagem inferiores a 1/30 segundos, de forma a evitar que as imagens capturadas surgissem desfocadas. O resultado final foi o chamado “*Tandem Scanning Confocal Microscope*” (TSCM), o primeiro microscópio confocal clinicamente utilizável para observação *in vivo* da córnea. A Figura 2.2 mostra o esquema da óptica deste microscópio.

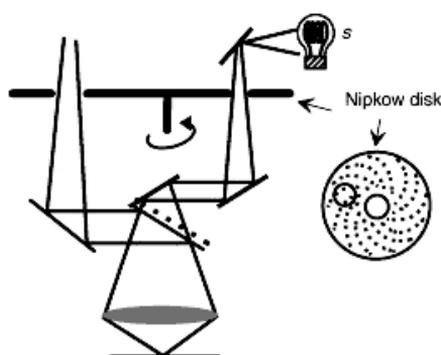


Figura 2.2 - Arranjo óptico de um *Tandem Scanning Confocal Microscope*. Adaptado de (Furrer, 2010)

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Versões clínicas destes microscópios foram produzidas pela Tandem Scanning Corporation (Reston, VA, EUA) e, mais tarde, pela Advanced Scanning Corporation (New Orleans, LA, USA). Actualmente, não é produzindo nenhum microscópio confocal da córnea do tipo TSCM.

Um outro tipo de microscópio confocal da córnea, o microscópio confocal de varrimento de fenda (*Scanning-Slit Confocal Microscope* – SSCM) tem uma história de desenvolvimento cuja origem poder ser colocada no microscópio especular de Maurice, utilizado para observação *ex vivo* do endotélio corneano (Maurice, 1968; Hoefle, 1970). Este microscópio, na sua versão final, já incluía várias características que ainda hoje se encontram nos microscópios confocais da córnea de varrimento de fenda. É o caso da utilização de uma objectiva que não aplanava a córnea, recorrendo a uma solução salina para assegurar o acoplamento óptico entre a córnea e a objectiva e da utilização de metade da abertura numérica da objectiva para iluminar a amostra, com a outra metade a servir para recolher a luz dispersa pela córnea. Utilizava duas fendas conjugadas, sendo portanto um instrumento confocal. Contudo, a imagem da fenda de iluminação não era varrida sobre o plano focal da objectiva. As fendas eram mantidas estáticas definindo o campo de visão do instrumento. Não era um instrumento para utilização clínica e, como tal, não incorporava soluções para o problema do movimento involuntário dos doentes. O próprio Maurice desenvolveu mais tarde este instrumento. Utilizou fendas mais estreitas e, de forma a obter um campo de visão extenso, fez com que a amostra se deslocasse através da imagem da fenda. A imagem era gravada num filme fotográfico que se movia em sincronia com a amostra.

Laing foi o primeiro a obter imagens *in vivo* do endotélio corneano, em animais e em humanos (Laing, 1975). Os autores lidaram com o problema do movimento, utilizando uma objectiva de imersão em água que terminava num cone. Este elemento óptico estava colado a uma lente de contacto rígida. Desta forma a córnea era aplanada e existia um efeito de sucção que reduzia muito a amplitude dos movimentos oculares, principalmente do movimento axial devido à pulsação

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

A utilização de fendas estreitas permite obter imagens com contraste elevado mas resulta num campo de visão de pequenas dimensões. Apesar de Svishchev ter sido o primeiro a construir um microscópio em que a imagem de uma fenda estreita era varrida sobre o plano focal da objectiva (Svishchev, 1969; Svishchev, 1971), Koester foi o primeiro a resolver de forma satisfatória este problema, tendo conseguido obter, pela primeira vez, imagens *in vivo* do endotélio corneano, com um campo de visão largo e em condições clínicas (Koester, 1980). Utilizou fendas confocais e um espelho rotativo para assegurar o varrimento das fendas de iluminação e de observação. A fenda de observação permite recolher apenas luz proveniente da região do plano objecto iluminada pela fenda de iluminação, bloqueando toda a luz proveniente de outras regiões. O instrumento utilizava uma objectiva aplanadora, para permitir a observação de um número elevado de células endoteliais no mesmo plano focal e para restringir os movimentos oculares.

Apesar do grande avanço que constituiu, o microscópio especular de campo largo de Koester apresentava limitações. A capacidade de visualizar outras camadas da córnea, que não o endotélio, era muito limitada, a objectiva aplanadora induzia dobras no interior da córnea e a necessidade de obter uma boa relação sinal-ruído levava a que a iluminação no olho do doente fosse muito intensa. Estas dificuldades foram resolvidas no microscópio SSCM desenvolvido por Masters e Thaer, cujo esquema óptico está representado na Figura 2.3. Este microscópio utilizava princípios apresentados por Maurice - objectiva de imersão em água não aplanadora com abertura numérica elevada, com um gel a fazer o acoplamento óptico entre a objectiva e a córnea - e Svishchev – varrimento e reconstrução da imagem realizados por um espelho duplo montado num oscilador. O arranjo confocal era realizado por duas fendas conjugadas.

O aspecto mais inovador deste microscópio foi a solução desenvolvida para o problema do movimento. Foi adoptada uma actualização interlaçada da imagem vídeo, com cada metade da imagem a ser formada por um varrimento completo da fenda através do plano focal da objectiva. Como a largura da fenda é ajustada para 1/30 da amplitude do varrimento, o tempo de exposição para cada região da córnea,

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

para um sinal vídeo padrão, é de apenas 0.66 ms. Desta forma conseguem-se imagens de elevado contraste com artefactos de movimento mínimos, como se demonstra pelas imagens do plexo nervoso sub-basal, onde não se observam descontinuidades nos nervos que cruzam toda a extensão da imagem.

Este microscópio permitia obter imagens de todas as camadas corneanas e está na base dos actuais microscópios SSCM clínicos.

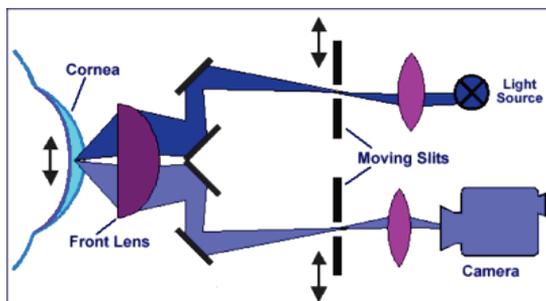
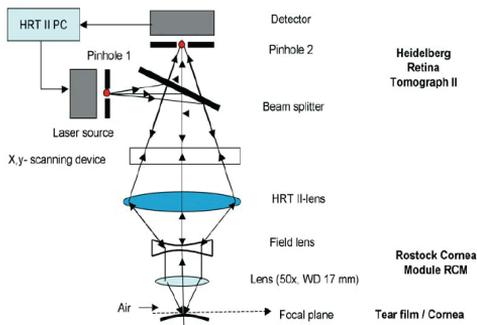


Figura 2.3 - Arranjo óptico de um *Scanning-Slit Confocal Microscope*. Adaptado de <http://www.nidektechnologies.it> (consultado em 29.01.13)

Um terceiro tipo de microscópio confocal da córnea surgiu mais recentemente. Foi desenvolvido no grupo do Prof. Guthoff (Stave, 2002) e consistiu num módulo óptico (RCM - *Rostock Cornea Module*) para instalação num tomógrafo confocal da retina comercial (HRT II – Heidelberg Retinal Tomograph II, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemanha) configurando assim um microscópio confocal da córnea de varrimento laser (LSCM – *Laser Scanning Confocal Microscope*). Neste instrumento, um laser é focado e varrido ao longo do plano da córnea a visualizar, por acção de um par de espelhos instalados em galvanómetros. Em cada instante, apenas é iluminado um ponto na córnea com um diâmetro da ordem de 1 μm . O instrumento utiliza uma objectiva não aplanadora. O acoplamento óptico é realizado por um gel. O microscópio mantém todas as funções de tomografia do HRT, empregues originalmente para avaliação do disco óptico. A Figura 2.4 mostra o arranjo óptico do microscópio RCM bem como o exemplar utilizado no CRIO – CHUC.

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*



(a)



(b)

Figura 2.4 - Microscópio confocal da córnea de varrimento laser: (a) Arranjo óptico. Adaptado de (Guthoff, 2006); (b): Heidelberg Retina Tomograph HRT II associado ao Rostock Cornea Module. CRIO - CHUC.

Alguns estudos apresentam resultados comparando diferentes microscópios confocais da córnea. Foi publicado um estudo que compara medições de densidades de queratócitos utilizando um microscópio TSCM (Model 165A, Tandem Scanning, Inc., Reston, VA, EUA) e um microscópio SSCM (ConfoScan 3 (Nidek Technologies America, Inc., Greensboro, NC, EUA) (McLaren, 2005). O estudo mostrou que, para córneas normais, os dois instrumentos produzem densidades de queratócitos que não diferem significativamente, desde que se tenha em conta a diferença na profundidade do volume amostrado (ou seja na resolução axial) entre os dois microscópios e sejam empregues métodos estereológicos correctos.

Um outro estudo (Salvetat, 2011) demonstrou que as avaliações do microscópio de varrimento laser (HRT II + RCM) apresentavam a tendência para sobrestimar as medições da espessura da córnea central, subestimar significativamente a contagem do número de células endoteliais, principalmente em olhos com contagem endotelial mais reduzida (< 2290 células/mm²) e sobrestimar a contagem endotelial em córneas com densidade mais elevada. A variabilidade entre as várias medições da espessura corneana central e do número de células endoteliais foi menor quando utilizado o

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

microscópio de varrimento de fenda Tomey ConfoScanP4 (Tomey Corporation, Cambridge, MA, EUA) (Salvetat, 2011).

Presentemente existem no mercado dois tipos de microscópios confocais da córnea: o microscópio SSCM Nidek Confoscan 4 (Nidek Co. Ltd., Aichi, Japão) e o microscópio LSCM HRT Rostock Cornea (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemanha). Os estudos apresentados neste trabalho foram realizados com um Tomey Confoscan P4 (Tomey, Fortune Technologies, Vigonza, Itália – ver Figura 2.5), um microscópio do tipo SSCM e com um microscópio LSCM HRT Rostock Cornea.

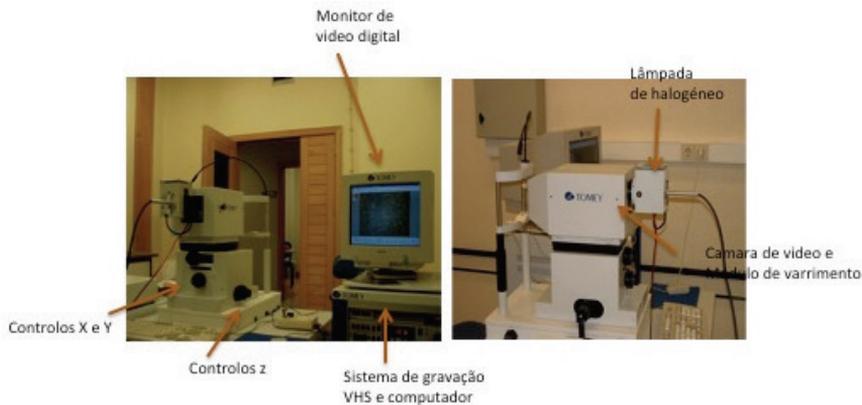


Figura 2.5 - Microscópio Confocal Tomey Confoscan P4. CRIO – CHUC e IBILI

2.2. CÓRNEA E PATOLOGIAS ESTUDADAS

A córnea é um tecido diferenciado de forma a permitir a refração e a transmissão da luz. As suas características são altamente especializadas com o fim de manter a transparência e resistir a factores externos adversos como a desidratação, a invasão microbiana e o traumatismo.

2.2.1. Anatomia da córnea

Na altura do nascimento, a córnea apresenta uma dimensão relativamente grande quando comparada com as restantes estruturas do globo ocular. Todo o globo ocular aumenta de tamanho consideravelmente durante os dois primeiros anos de vida. O diâmetro da córnea acompanha este crescimento, mantendo-se depois sem grandes variações para o resto da vida (Klyce, 1998).

Em termos ópticos, a córnea é basicamente uma lente convexa-côncava. A superfície anterior da córnea apresenta uma forma elíptica, com um eixo maior (meridiano horizontal) de 12,6 mm e um eixo menor (meridiano vertical) de 11,7 mm. Ao observarmos a córnea pela sua face posterior, esta apresenta uma forma circular com cerca de 11,7 mm de diâmetro. A espessura média da córnea é de cerca de 520 µm na região central e 650 µm na região mais periférica (Maurice, 1984). Este facto faz com que a superfície posterior da córnea seja mais curva que a anterior. A curvatura anterior não é uniforme, apresentando uma curvatura mais acentuada na região central e mais plana na região periférica. O achatamento periférico é maior nos quadrantes nasal superior e temporal inferior. O raio de curvatura médio é de cerca de 7,8 mm na superfície anterior na zona central da córnea e de 6,8 mm na superfície posterior (Katz, 1989). O poder refractivo médio da córnea é de 43 dioptrias o que corresponde a cerca de 70% do poder refractivo total do sistema óptico ocular (Duke-Elder, 1970).

A transparência da córnea é assegurada pela organização estrutural específica das fibras de colagénio do estroma, pela sua avascularidade, pela ausência da capa de mielina nos nervos corneanos e pela capacidade de manter um estado de hidratação controlado. O epitélio corneano contacta directamente com o filme lacrimal e o

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

endotélio com o humor aquoso. Sendo estes líquidos os principais responsáveis por manter a nutrição e fisiologia corneana, permitem à córnea ser uma estrutura avascular.

Waring (Waring, 1992) subdividiu a córnea em seis camadas (ver Figura 2.6): *epitélio*, *membrana basal*, *camada de Bowman*, *estroma*, *membrana de Descemet* e *endotélio*. Apesar do filme lacrimal não ser uma camada corneana, é fundamental para a função óptica da córnea.

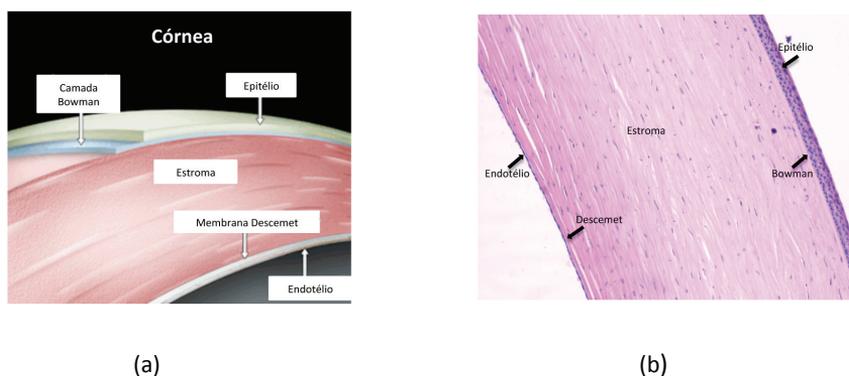


Figura 2.6 – Camadas corneanas: (a) esquema que representa a divisão das diferentes camadas corneanas; (b) secção histológica em que se visualizam estas camadas.

Filme Lacrimal

O filme lacrimal é constituído por três camadas descritas por Wolf (Wolf, 1946). Estas camadas são, no sentido antero-posterior, a camada lipídica, aquosa e mucínica. O volume do filme lacrimal é de cerca de 10 μl (Mishima, 1966). Na literatura encontram-se valores da espessura do filme lacrimal que variam entre 3 μm (King-Smith, 1999; Wang, 2003) e 35 μm (Prydal, 1992). A produção basal do filme lacrimal é de cerca de 1.2 $\mu\text{l}/\text{min}$, podendo aumentar para 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ quando estimulada (Fullard, 1990).

A camada lipídica apresenta uma espessura de 80 nm, é produzida pelas glândulas de Meibomius e em menor quantidade pela glândulas de Zeiss e Moll. Estas glândulas libertam a secreção pelo efeito do pestanejar. Na sua porção mais anterior, a camada lipídica é composta por lípidos de baixa polaridade, nomeadamente colesterol e

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

triglicerídeos (Brown, 1969). No restante, encontramos lípidos de alta polaridade como glicolípídeos, ácidos gordos livres, álcoois alifáticos e uma pequena quantidade de lecitina. A principal função da camada lipídica é retardar a evaporação do filme lacrimal. Para além disso, contribui ainda para a barreira de proteção contra os agentes microbianos externos e para manter uma superfície refractiva adequada.

A camada aquosa apresenta uma espessura de cerca de 6 a 7 μm , o que corresponde a cerca de 95% da espessura total do filme lacrimal. Esta camada é segregada pela glândula lacrimal principal e pelas glândulas acessórias de Raouf e de Wolfring e contém proteínas (lactoferrina e lisozima anti-infecciosas), electrólitos, metabolitos, enzimas, citoquinas, imunoglobulinas (sobretudo Ig A), factores de crescimento e células imunocompetentes (Records, 1988). A sua função é fundamentalmente de hidratação, de defesa e manutenção.

A camada de mucina contribui para estabilidade do filme lacrimal sobre o epitélio corneano. Constitui 0.2 % do filme lacrimal e apresenta uma espessura de 0.02-0.04 μm . É constituída por uma subcamada interna muito fina e uma subcamada externa mais espessa. A camada de mucina é produzida pelas células caliciformes que estão distribuídas por toda a superfície conjuntival. As funções da camada mucosa são permitir que a superfície epitelial esteja sempre humidificada, graças ao efeito surfactante (que diminui a tensão superficial do componente aquoso do filme lacrimal) e desta forma melhorar a adesão do filme lacrimal às células epiteliais, proteger física e imunologicamente perante agentes infecciosos e lubrificar a córnea para facilitar o deslizamento palpebral.

Alguns autores contestam o esquema de organização do filme lacrimal em três camadas perfeitamente delimitadas (Prydal, 2005; Chen, 1997). De acordo com novas evidências, a mucina tenderia a invadir a camada aquosa de tal forma que poderia influenciar a camada lipídica superficial.

Epitélio

O epitélio corneano é do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado, formado por 5 a 7 camadas de células, com uma espessura total de 50-56 μm (Li, 1997). Na zona periférica o número de camadas celulares aumenta para 8-10 μm (Ehlers, 1970).

O epitélio corneano desempenha diferentes funções: transparência óptica; protecção física; barreira à penetração de fluidos e microrganismos; estabilização da lágrima. Neste contexto as adesões célula-célula e célula-matriz extracelular são importantes para a manutenção da estrutura estratificada do epitélio. A presença de diferentes complexos de junção entre as células adjacentes previne a passagem de agentes externos para as camadas mais profundas. As *tight junctions* (*zonula occludens*) estão presentes fundamentalmente entre as células superficiais do epitélio o que proporciona uma barreira altamente efectiva de forma a impedir a penetração do filme lacrimal. Os hemidesmossomas (*zonula adherens*) e desmossomas estão presentes em todas as camadas do epitélio corneano, enquanto as “gap junctions”, que permitem a passagem de pequenas moléculas, entre as células estão presentes nas células em asa e basais (Nischida, 2011).

No epitélio distinguimos três camadas de células: as superficiais escamosas, as intermédias e as basais

A camada superficial de células escamosas é formada por duas a três camadas de células achatadas e poligonais com um diâmetro entre 40 e 60 μm e 2 a 6 μm de espessura (Nischida, 2011), apresentando microvilosidades na sua membrana (Pfister, 1973). As células superficiais sofrem um processo de descamação (Hanna, 1961; Miller, 1990) e apresentam, na microscopia electrónica, aspectos diferentes de acordo com a fase de maturação. As células jovens apresentam-se claras e pequenas e as hiper maduras escuras e de maior tamanho, correspondendo estas à fase de pré descamação. As células jovens caracterizam-se pela grande quantidade de microvilosidades e micropregas (Pfister, 1973), ao contrário do que acontece nas células hiper maduras, que apresentam uma membrana apical lisa (Gipson, 1994). Numerosas moléculas de glicoproteínas e glicolípidos encontram-se embutidas na

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

membrana das células superficiais formando o glicocálix, o que confere propriedades hidrofílicas à face anterior destas células. O glicocálix interage com a camada de mucina do filme lacrimal e ajuda a manter a sua estrutura trilaminar (Argüeso, 2001).

A camada intermédia do epitélio é constituída por células num estadio intermédio de diferenciação entre as células basais e as superficiais, denominadas células em asa de Ranvier. Estas células dispõem-se em 2 a 3 camadas na zona central da córnea, número que aumenta para 4 a 5 na zona periférica. Apresentam uma forma poligonal e um núcleo grande ovoide e central. As suas membranas apresentam muitas interdigitações e estão unidas por numerosos desmossomas, *zonula adherens* e *gap junctions* (Nischida, 2011).

A camada basal é uma camada única de células germinativas do epitélio corneano que estão interligadas por desmossomas, *gap junctions* e *zonula adherens* e ligadas à membrana basal por hemidesmossomas (Nischida, 2011). Fibrilhas de ancoragem situadas na membrana basal, compostas por colagénio VII penetram na estrutura do estroma onde formam placas de ancoragem de colagénio tipo I. Esta rede de microestruturas de adesão permite manter o epitélio unido ao estroma de forma a resistir a múltiplas tensões mecânicas (McMenamin, 1997). As células basais são as únicas células do epitélio que proliferam, diferenciando-se em células em asa e posteriormente células superficiais (Nischida, 2011). O processo de diferenciação dura entre 7 a 14 dias. São células cilíndricas com cerca de 18 µm de altura e 10 µm de largura. O núcleo é ovoide, proeminente, com o maior eixo perpendicular à membrana basal.

No epitélio da córnea encontram-se células não epiteliais como linfócitos, melanócitos, macrófagos e células de Langerhans (Hogan, 1971; Kardon, 1994). As células de Langerhans são macrófagos especializados implicados na resposta imune que são abundantes na periferia da córnea normal mas não se encontram na sua região central (Gillette, 1982). Estas células apresentam-se como células dendríticas com um diâmetro de 12–15 µm, longos prolongamentos citoplasmáticos e um citoplasma ligeiramente eosinofílico e núcleo relativamente grande, pálido, vesicular e oblongo (Risdall, 1983). A membrana das células de Langerhans expressa o sistema

HLA (*human leucocyte antigen*) que actua na resposta imune ao apresentar antígenos aos linfócitos T (Rubsamen, 1984; Whitsett, 1984).

Membrana Basal

A membrana basal do epitélio corneano é uma camada acelular de 40 a 60 nm (Nischida, 2011) de espessura, formada por colagénio, fundamentalmente tipo IV, laminina e proteoglicanos, que serve de suporte às células da camada basal (Kabosova, 2007). Esta membrana é produzida pelas células epiteliais da camada basal bem como pelas fibras do estroma, anterior durante o desenvolvimento embrionário. A sua produção pelas células basais mantém-se durante toda a vida do indivíduo, embora numa forma mais lenta. A membrana basal tem um papel fundamental na cicatrização por servir de suporte às células da camada basal. Na ausência de membrana basal pode ocorrer um crescimento das células epiteliais para a camada de Bowman e para o estroma anterior. Quando observada ao microscópio electrónico, a membrana basal é formada por duas camadas, uma zona clara anterior - lâmina lúcida - e uma zona posterior mais densa - lâmina densa (Kuwabara, 1970).

A membrana basal juntamente com os hemidesmossomas e as fibrilhas de ancoragem, participa na adesão das células epiteliais ao estroma. Os hemidesmossomas aderem as células basais à lâmina basal e às fibrilhas de ancoragem.

Os nervos corneanos atravessam a membrana basal para se dirigirem ao epitélio onde acabarão por terminar quase na sua superfície.

Camada de Bowman

A camada de Bowman tem por função manter a integridade e a organização epitelial, bem como separar o epitélio do estroma. A Bowman é uma zona acelular, com cerca 10 a 15 μm de espessura (Edelhauser, 2002) com diminuição progressiva para a periferia, terminando na zona de junção corneo-escleral (Pouliquen, 1984). A camada de Bowman está presente só nos primatas e é produzida pelos queratócitos na fase embrionária (Nischida, 2011). Esta camada corresponde a uma organização de fibras de colagénio - tipos I e III - e proteoglicanos, onde assentam directamente as células basais do epitélio. O diâmetro das fibras de colagénio da camada de Bowman é menor que o diâmetro das fibras de colagénio do estroma. Nas zonas mais profundas, estas fibras aumentam de diâmetro e vão-se transformando gradualmente nas fibras estromais. A adesão desta camada ao estroma é quase imperceptível, ao contrário do que sucede relativamente à membrana basal do epitélio, onde existe uma delineação evidente. Ainda que anteriormente se tenha dado muita importância à camada de Bowman para a manutenção da transparência da córnea, esta transparência mantém-se, assim como a adesão epitelial, após efectuarmos a sua excisão na queratectomia fotorefractiva. Neste caso, a regeneração do epitélio, na ausência da camada de Bowman, efectua-se sobre o estroma, havendo estudos que referem que a destruição permanente da camada de Bowman não afecta a maturação epitelial normal (Marshall, 1988; Goodman, 1989; Amano, 1993).

Estroma corneano

O estroma é um tecido conjuntivo composto por queratócitos, lamelas de colagénio e substância fundamental (Klyce, 1998). A espessura central do estroma corneano varia entre 500 e 540 μm , sendo maior na periferia onde pode atingir os 700 μm . Desta forma, o estroma contribui para cerca de 90% da espessura total da córnea (Nischida, 2011).

Os queratócitos assemelham-se aos fibroblastos e correspondem a 3-5 % do estroma corneano. O seu *turnover* é de cerca de 3 anos (Nischida, 2011). Os queratócitos são células largas, achatadas, dispostas entre as lamelas de colagénio,

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

com prolongamentos celulares que se estendem do corpo celular numa forma estrelada. Estes prolongamentos orientam-se no mesmo plano da lamela e aderem aos outros queratócitos por *gap junctions* (Ueda, 1987). Os queratócitos mantêm a estrutura das lamelas e da matriz extracelular ao sintetizar proteoglicanos e colagénio. Perante uma agressão, os queratócitos quiescentes migram de forma a restaurar as estruturas lesadas, transformando-se em miofibroblastos. Os miofibroblastos produzem matriz extracelular, enzimas de degradação do colagénio, metaloproteinases e citoquinas que contribuem para a reparação tecidual. A sua capacidade de contração contribui também para o processo de cicatrização (Nischida, 2011). Assim, nas cirurgias por laser excimer, os queratócitos aumentam a sua actividade nas zonas próximas da intervenção, condição que pode durar vários meses.

O colagénio presente no estroma é fundamentalmente do tipo I (75%) e em pequenas quantidades tipos III, V e VI (Yue, 1986). O colagénio estromal encontra-se altamente organizado formando lamelas em rede. As fibras de colagénio apresentam 22.5-35 nm de diâmetro (Giraud, 1975) com uma distância uniforme entre elas de cerca de 42 nm (Nischida, 2011). Estas fibras dispõem-se paralelamente umas às outras em cada lamela e vão de limbo a limbo. Entre as lamelas a orientação é oblíqua, apresentando tendência a uma orientação vertical e horizontal, provavelmente para compensar as deformações causadas pela musculatura extrínseca do globo ocular. O diâmetro estreito das fibras é uma característica que contribui para a transparência corneana. As lamelas entrecruzam-se mais densamente no terço anterior do estroma onde são mais estreitas e entrelaçadas (Klyce, 1998). No estroma posterior apresentam uma disposição mais regular e paralela à superfície da córnea (Klyce, 1998). A disposição característica das fibras e das lâminas de colagénio assegura uma tensão uniforme em toda a estrutura da córnea. O espaço interfibrilar contém proteoglicanos contendo cadeias de glicosaminoglicanos do tipo queratano sulfato e dermatano sulfato (Nischida, 2011). Os proteoglicanos unem-se às fibras de colagénio de forma ordenada (um proteoglicano a um ponto específico de união), o que é essencial para o ordenamento e o espaçamento interfibrilar (Scott, 1991).

Membrana de Descemet

A membrana de Descemet é uma camada homogénea e fina (8-12 μm) que se mantém tenuemente unida ao estroma. A linha de *Schwalbe* marca a terminação da membrana de Descemet na junção córneo escleral. A membrana de Descemet corresponde à membrana basal do endotélio e é produzida pelas células endoteliais. Surge pelo quarto mês de gestação, apresentando na altura do nascimento aproximadamente 3 μm de espessura, e aumenta para o resto da vida cerca de 1 μm por década (Edelhauser, 2002). Na observação desta camada à microscopia electrónica distinguem-se duas regiões: anterior e posterior. A região anterior com cerca de 2 μm de espessura é formada por fibrilhas finas de colagénio tipo VIII com um arranjo hexagonal. Esta região encontra-se presente aos 5 meses de gestação (Jhonson, 1982). O aumento da espessura da membrana de Descemet ao longo da vida ocorre fundamentalmente na região posterior (Jhonson, 1982). A região posterior é formada por colagénio tipo IV, VIII, fibronectina e glicoproteínas (Hirsch, 1978). Devido a esta constituição, apresenta uma grande elasticidade e resistência, ainda maior que a do estroma, perante agressões traumáticas e inflamatórias (Tseng, 1989).

Quando danificada, a membrana de Descemet destaca-se facilmente do estroma e regenera rapidamente. Contudo, numa situação de ruptura e uma vez ocorrendo recobrimento por células endoteliais, a membrana não regenera. As células endoteliais quando estimuladas por inflamação, traumatismos ou distúrbios genéticos podem levar a uma aumento do depósito de colagénio ocasionando um espessamento da Descemet.

Endotélio da córnea

O endotélio corneano corresponde a uma monocamada de células cuboides, contíguas, que formam um mosaico típico hexagonal. A espessura desta camada é de 4 a 6 μm . As células endoteliais apresentam uma elevada actividade metabólica. Na microscopia electrónica apresentam uma superfície lisa, com bordos muito bem definidos, um núcleo esférico que ocupa quase toda a célula e um citoplasma com numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e liso e aparelho de Golgi.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Estes organelos estão tipicamente envolvidos na síntese molecular e na produção de energia.

As células endoteliais não apresentam adesões especializadas em relação à membrana de Descemet, mas entre si apresentam interdigitações com vários tipos de complexos juncionais incluindo *zonula occludens*, *macula occludens* e *macula adherens*, pelo que não existem espaços intercelulares. As *gap junctions* permitem a transferência de pequenas moléculas e electrólitos entre estas células. Estas interdigitações facilitam o aumento de tamanho das células que compensa a perda celular constante (Waring, 1982). De facto, o endotélio não apresenta capacidade para se renovar. Isto leva a uma perda da população das células endoteliais com a idade (Laule, 1978). Quando uma célula endotelial é danificada, as outras células em seu redor aumentam de tamanho de forma a preencher o espaço, resultando assim uma alteração estrutural denominada polimegatismo (Edelhauser, 2002). Este aumento das dimensões celulares leva a uma diminuição da espessura desta camada, preservando assim as funções normais da córnea. Para além do polimegatismo, a perda endotelial manifesta-se também pelo pleomorfismo (diversidade da forma) associado a um aumento da permeabilidade destas células (Waring, 1982). A perda das células endoteliais pode ocorrer de forma exagerada nas distrofias ou secundária a outras patologia ou cirurgia ocular. No adulto jovem existem cerca de 3 500 células/mm². O valor crítico abaixo do qual a função endotelial é colocada em risco ronda as 800 células/mm². O coeficiente de variação da área média celular é o parâmetro mais sensível na avaliação da disfunção endotelial enquanto a hexagonalidade é um bom índice da progressão da cicatrização endotelial.

A função mais importante do endotélio é o controlo da penetração de substâncias a partir do humor aquoso de forma a assegurar a hidratação normal do estroma. As células endoteliais contêm um sistema de transporte de iões que se opõe à entrada de humor aquoso no estroma. Um gradiente osmótico de Na⁺ está presente entre o humor aquoso e o estroma. Este gradiente resulta no influxo de Na⁺ do humor aquoso para o estroma e no transporte de K⁺ no sentido oposto. Esta actividade denomina-se bomba endotelial. A Na⁺-K⁺ATPase, localizada na membrana celular, proporciona a

actividade mais importante para esta acção. Apesar das alterações produzidas pela idade, o efeito de barreira e de bomba do endotélio não se alteram.

Nervos corneanos

A córnea é o tecido mais enervado do corpo humano. Esta enervação é efectuada pelo nervo oftálmico, divisão do nervo trigémio, via os nervos ciliares anteriores e os que rodeiam a conjuntiva. Os nervos penetram a córnea no estroma médio e anterior e invadem a córnea em direcção central e anterior, numa forma radiária, originando os ramos que enervam o estroma médio e anterior. Alguns ramos conectam entre si no centro do estroma (Marfurt, 2010), mas a maioria divide-se em ramos mais pequenos que penetram superiormente no epitélio. Na interface, entre a camada de Bowman e o estroma anterior, organizam-se no plexo nervoso sub-basal. Atravessam entretanto o epitélio, constituindo a rede epitelial (Marfurt, 2010; He 2010) e terminam a nível da camada de células superficiais (Oliveira-Soto, 2001). Enquanto a enervação epitelial, na zona corneana justa límbica, é efectuada pelos nervos que derivam da rede superficial que rodeia a zona límbica, os nervos epiteliais centrais derivam da rede de nervos estromais.

A densidade dos nervos epiteliais é maior a nível central que na periferia. A densidade dos nervos epiteliais na córnea adulta humana normal, expressa como percentagem da área, está referida como 18.78 ± 2.06 na área central e 11.05 ± 2.27 na área periférica (He, 2010). A nível do estroma a densidade dos troncos nervosos é cerca de 32.6 ± 6.4 , sendo referida uma redução progressiva da densidade dos nervos corneanos com a idade (He, 2010).

Os nervos corneanos não apresentam capa de mielina (Guthoff, 2006), uma vez que perdem esta capa 1 a 2 mm depois de entrarem no estroma, e são rodeados por células Schwann (Patel DV, 2005). No entanto, num estudo anteriormente realizado por Muller, está demonstrado que os nervos localizados no estroma anterior periférico podem ser mielinizados (Muller, 1996).

2.2.2. Diabetes e Córnea

A diabetes é uma doença relativamente comum e que influencia substancialmente a córnea. A nível ocular podem ocorrer retinopatia, neuropatia óptica, glaucoma neovascular, queratopatia e síndrome de olho seco (Kaji, 2005). A retinopatia diabética é a causa mais frequente de perda da AV em humanos entre os 25 e os 65 anos de idade (Infeld, 1998). A queratopatia diabética tem sido subestimada na avaliação dos doentes diabéticos. As alterações corneanas secundárias à diabetes ocorrem em todas as camadas. A queratopatia diabética manifesta-se por queratite puncteada superficial, erosões epiteliais, defeitos epiteliais persistentes (Schultz, 1981) e um risco acrescido de infecções microbianas. Antes do aparecimento dos sintomas, ocorrem anomalias subclínicas que incluem alterações da barreira epitelial (Gekka, 2004; Gobbels, 1989; Yokoi, 1997), espessamento da membrana basal (Azar, 1989; Azar, 1992), anomalias no tamanho das células epiteliais e endoteliais - aumento do pleomorfismo e polimegatismo - (Matsuda, 1987; Meyer, 1988; Datiles, 1990; Tsubota, 1993; Ohguro, 1995; Hosotani, 1995) e diminuição da sensibilidade corneana (Hosotani, 1996; Fujishima, 1996; Schultz, 1983).

A avaliação microscópica da córnea diabética mostra células epiteliais mais largas, pleomórficas, irregulares e com poucas microvilosidades, sugerindo a dificuldade de cicatrização que se associa à diabetes (Tsubota, 1991). A hiperglicémia crónica afecta a adesão dos hemidesmosomas entre o epitélio e a membrana basal o que condiciona erosões epiteliais mais frequentes. Para além disso, a hiperglicémia atrasa a mitose das células basais do epitélio o que leva à fraca adesão aos poucos hemidesmosomas existentes, condicionando um ciclo de cicatrização seguido de mais erosões corneanas. Taylor demonstrou, a nível histológico, em córneas diabéticas, espessamento e multilaminação da membrana basal (Taylor, 1981) associada a uma diminuição da penetração das fibras de colagénio tipo IV demonstrada por Azar (Azar, 1989), o que pode contribuir para a diminuição da adesão das células epiteliais. Os produtos avançados da glicação (AGEs - *advanced glycation end products*) depositam-se na membrana basal da córnea dos doentes diabéticos (Kaji, 2000) e alteram a estrutura molecular dos componentes da membrana basal e a sua capacidade adesiva.

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

O aumento do metabolismo do sorbitol tem sido apontado como a causa para esta queratopatia (Kinoshita, 1979; Akagi, 1984). Foi demonstrado que o *stress* osmótico originado pela acumulação do sorbitol leva às lesões provocada pela diabetes (Kinoshita, 1988; Chung, 2003). Em condições de hiperglicemia, cerca de 30% da glicose é desviada para a via do sorbitol, sendo transformada em frutose com ajuda das enzimas aldose-redutase e sorbitol-desidrogenase (Cheng, 1986). Uma vez que a frutose e os seus metabolitos, são agentes não enzimáticos mais potentes que a glicose, o fluxo de glicose na via do sorbitol leva à formação e ao aumento endógeno de AGEs. Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade de modificarem as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. A partir da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, *stress* oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios. Na literatura encontra-se bem evidenciada esta contribuição dos produtos avançados de glicação e dos produtos iniciais da reação de Maillard no desenvolvimento e na progressão das complicações da diabetes (Monnier, 2005; Ahmed, 2005; Huebschmann, 2006). Akagi reportou uma acumulação de poliols e expressão da enzima aldose-redutase no epitélio corneano e endotélio corneanos (Akagi, 1984), isto é, nas camadas corneanas que sofrem maiores alterações com a diabetes. Em modelos animais, foi demonstrada a eficácia do inibidor da aldose redutase na prevenção da perda da sensibilidade corneana (Hosotani 1996), no atraso de cicatrização dos defeitos epiteliais (Awata, 1988), no aumento do tamanho das células epiteliais e endoteliais (Matsuda, 1987; Meyer, 1988; Datiles, 1990), na ruptura da função de barreira do epitélio (Yokoi, 1997) e na acumulação de sorbitol (Matsuda, 87). Num outro estudo, em doentes diabéticos, Hosotani demonstrou uma melhoria no alargamento das células corneanas epiteliais e no restabelecimento da função de barreira epitelial, com a utilização dum inibidor da aldose redutase (Hosotani, 1995), embora não tenha ficado demonstrada a prevenção da queratopatia. Pondera-se assim que, para além da acumulação do sorbitol, outros mecanismos estejam envolvidos no desenvolvimento da queratopatia diabética.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

A integridade das fibras nervosas corneanas é fundamental para a manutenção da função de protecção corneana, nomeadamente para a manutenção da integridade do epitélio. A neuropatia periférica da diabetes, cuja severidade está relacionada com a duração de hiperglicemia (Clark, 1995), é caracterizada pela perda das fibras de mielina dos nervos, espessamento irregular das células de Schwann e degeneração axonal. Esta neuropatia condiciona uma capacidade diminuída de recuperação do *stress* secundário à hipóxia e perda da sensibilidade corneana, que leva a um aumento do risco do aparecimento de úlceras neurotróficas (Hyndiuk, 1977; Lockwood, 2006). Clinicamente, estas úlceras podem evoluir em três estadios: 1. Hiperplasia epitelial, irregularidade e erosão puncteada superficial e eventualmente neovascularização superficial; 2. Defeito epitelial persistente com bordos suaves e arredondados; 3. Envolvimento estromal com progressão para “melting” e risco de perfuração (Bonini, 2003).

Presume-se que vários neuromediadores são importantes na manutenção da integridade do epitélio. Após a deservação, os níveis de substância P e acetilcolina encontram-se substancialmente diminuídos em ratos (Shimizu, 1987). Foi demonstrado *in vitro* que a substância P e a acetilcolina induzem proliferação epitelial e que a produção destes neurotransmissores, pelos nervos sensitivos, é induzida pelo NGF (*Nerve Growth Factor*) (Reid, 1993). Esta possível relação entre a diminuição na expressão do NGF e o aumento do risco de úlceras neurotróficas foi reforçada pela demonstração de que o NGF melhora a integridade e a sensibilidade em doentes com estas úlceras (Lambiase, 1998).

Na neuropatia diabética, para além da degeneração estrutural das fibras nervosas, foi demonstrada uma diminuição da densidade dos nervos epiteliais (Rosenberg, 2000; Malik, 2003; Popper, 2005), com algum grau de compensação pelos nervos estromais, embora estes também apresentem alterações. Esta perda de fibras nervosas contribui também para a dificuldade de cicatrização dos defeitos epiteliais nestes doentes (He, 2012). Clinicamente, à observação por MCC, verifica-se que espessura média destes nervos é significativamente mais elevada em doentes diabéticos, quando comparada com indivíduos normais (Mocan, 2006). Na diabetes, os nervos do plexo sub-basal

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

apresentam-se ainda mais tortuosos do que que nos indivíduos normais (Kallinikos, 2004; Mocan, 2006).

Estudos efectuados em modelos animais, em condições de hiperglicemia, demonstraram alterações nas fibras de colagénio da Descemet que podem corresponder a alterações na síntese do colagénio pelas células endoteliais ou a um agrupamento alterado de fibras de colagénio, induzido pela glicosilação das fibras normais (Rehany, 2000b).

Apesar de, na prática clínica corrente, a MCC *in vivo* não ser utilizada para o seguimento dos doentes diabéticos, acreditamos que esta situação pode vir a ser alterada num futuro próximo. Na diabetes foram publicados vários estudos de avaliação corneana utilizando esta técnica (Rehany, 2000a; Morishige, 2001; Messmer, 2010; Tavakoli, 2011a; Pritchard, 2011). Uma vez que a diabetes origina uma neuropatia periférica e os nervos corneanos são facilmente visualizados por MCC, a grande maioria dos estudos publicados incidiu na avaliação da morfologia da enervação corneana (Patel DV 2009; De Cillà, 2009; Tavakoli, 2011a; Efron, 2011; Pritchard, 2011). De facto, nos últimos dez anos vários grupos apresentaram trabalhos com a finalidade de avaliação da neuropatia diabética através da morfologia dos nervos corneanos (Malik, 2003; Kallinikos, 2004; Midena, 2006; Midena, 2009; Nitoda, 2012; Pritchard, 2011; Hume, 2012; Nabavi, 2012; Ahmed, 2012). Neste domínio temos também apresentado trabalhos, tendo sido o nosso grupo o primeiro a demonstrar que a densidade das fibras nervosas em diabéticos é significativamente inferior à observada em controlos normais, mesmo para uma curta duração da doença (Popper, 2005). Actualmente participamos num projecto que tem por objectivo o desenvolvimento de uma técnica automática para o diagnóstico precoce e o seguimento da neuropatia diabética periférica, através da avaliação de parâmetros morfométricos do plexo nervoso sub-basal da córnea (Silva, 2012).

Foi ainda estudada a densidade celular das diferentes camadas corneanas nos doentes diabéticos (Frueh, 1995; Chang, 2006; Chen, 2009; Shenoy, 2009). Conforme apresentaremos mais adiante, o nosso grupo realizou estudos nesta área, tendo sido o primeiro a mostrar a diminuição da densidade das células basais nos diabéticos

(Quadrado, 2006) o que pode contribuir para explicar a dificuldade de cicatrização epitelial nestes doentes.

2.2.3. Cistinose e Córnea

A cistinose, é uma doença lisosómica autosómica recessiva, que se caracteriza pela acumulação de cistina intracelular a nível dos lisossomas. A cistina em excesso forma cristais que danificam as células em diferentes órgãos, afectando em particular as células do fígado, cérebro e rim. A nível ocular, os cristais podem surgir na córnea, conjuntiva, íris, corpo ciliar, esclera, coróide, epitélio pigmentar da retina, músculos extraoculares e nervo óptico (Schneider, 1977; Schneider, 1990; Gahl, 2002). A idade de aparecimento condiciona a gravidade da doença, sendo esta subdividida em três grupos: nefropática infantil; nefropática do adolescente e forma do adulto não nefropática (Wilson, 1992; Attard, 1999). A forma infantil é a mais severa, sempre com atingimento renal, e resulta da ausência completa do transporte renal da cistina, levando a insuficiência renal pelos 10 anos de idade (Cantani, 1983; Gahl, 1987). Na forma infantil, os cristais corneanos surgem pelos 16 meses de idade, aumentam a sua densidade durante a primeira década de vida, estabilizam pela adolescência (Iwata, 1994; Tsilou, 2002; Tsilou, 2006; Tsilou, 2007) e levam uma diminuição da acuidade visual, erosões recorrentes, sensação de corpo estranho e fotofobia acentuada (Kocabora, 2008; Servais, 2008). As formas mais tardias, isto é as formas juvenil e ocular, apresentam manifestações sistémicas mais limitadas pelo facto de apresentarem alguma função residual de transporte transmembranar a nível renal. Ainda assim os cristais corneanos estão presentes também nestas formas da doença (Anikster, 2000). Vários estudos efectuados por MCC *in vivo* demonstraram a presença dos cristais de cistina no epitélio e estroma corneanos, com aspecto em agulha e hiperreflectivos (Grupcheva, 2002; Alsuhaibani, 2005; Fung, 2007; Labbé, 2009; Tavares, 2009).

O tratamento oral com cisteamina (β -mercaptoetilamina) resulta na depleção da cistina dos lisossomas e este tratamento deve ser iniciado o mais precocemente possível. Esta droga, ao contornar o defeito do transporte da cistina, tem melhorado

substancialmente o prognóstico desta doença (Gahl, 1987; Tsilou, 2003). No entanto, as manifestações oculares não melhoram substancialmente com o tratamento sistêmico, provavelmente pela fraca biodisponibilidade desta substância a nível da córnea (Hsuan, 1996; Jones, 1991; Kaiser-Kupfer, 1987). A cisteamina pode ser aplicada por via tópica, mas a sua instabilidade é grande e apresenta pouca penetração na córnea (Jones, 1991; Hsuan, 1996; Gahl, 2000). A utilização tópica deste fármaco levou à necessidade de estudar e documentar quantitativamente a sua eficácia terapêutica, esforço em que nós participámos e cujos resultados apresentamos no capítulo Estudos Publicados deste trabalho.

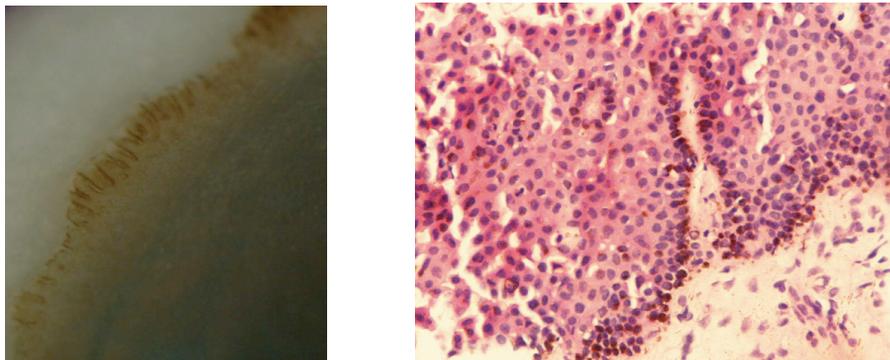
2.2.4. Insuficiência Límbrica

O conceito de células estaminais límbricas levou a um melhor entendimento das estratégias de reparação do epitélio corneano, a uma nova classificação das várias doenças da superfície ocular e à utilização destas células nos processos de reconstrução epitelial – *transplante de células límbricas* (Lavker, 2004).

A insuficiência límbrica caracteriza-se pela perda total ou parcial de células estaminais do epitélio corneano, alterando-se desta forma a sua capacidade regenerativa (Puangsricharern, 1995). A presença das células estaminais do epitélio corneano está documentada desde longa data, bem como o movimento centrípeto destas células da periferia para o centro da córnea (Schermer, 1986; Thoft, 1989). Várias evidências clínicas (Lavker, 2004) e experimentais sugerem que as células precursoras do epitélio corneano se encontram no limbo, o que levou ao surgimento de novas técnicas cirúrgicas, nomeadamente transplantes querato-límbricos e enxertos celulares de células expandidos *ex vivo*, podendo ser, em ambos os casos, de origem autóloga ou alogena. Estas células estaminais localizam-se mais concretamente ao nível do epitélio que recobre as Palissadas de Vogt (Espana, 2002; Li, 2007) e estas localizam-se no limbo córneo escleral (Townsend, 1991). A Figura 2.7 mostra as Palissadas de Vogt a nível biomicroscópico e a correspondente imagem histológica. As imagens foram obtidas a partir de botões corneanos de dadores cadáver do Banco de

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Olhos do Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia (CRIO) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).



(a)

(b)

Figura 2.7 – Palissadas de Vogt: (a) Biomicroscopia do limbo corneano de botão de dador cadáver do Banco de Olhos do CRIO – CHUC; (b) imagem histológica (HE; 10x) do limbo corneano de botão de dador cadáver (Laboratório de Patologia Ocular, CRIO – CHUC) onde são visíveis melanócitos na camada basal do epitélio límbico.

O limbo é uma estrutura da superfície ocular, considerada uma entidade anátomo-funcional, com duas funções principais: a regeneração do epitélio corneano e a função de barreira ao crescimento do epitélio conjuntival em direcção à córnea (Thoft, 1989; Ahmad, 2010). Recentemente, em estudos efectuados *in vitro*, foram descritas três estruturas na microanatomia do limbo que podem actuar como nicho potencial de células estaminais: as criptas epiteliais límbicas (Dua, 2005), as criptas límbicas e as projecções focais estromais (Shortt, 2007).

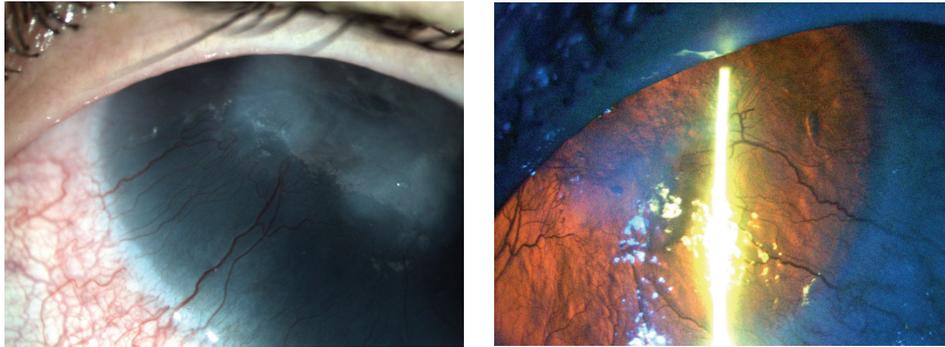
As criptas límbicas descritas por Shortt (Shortt, 2007) parecem corresponder às “*rete ridges*” descritas por Townsend em 1991 (Townsend, 1991) isto é, são projecções de epitélio estratificado para a profundidade, na direcção do estroma, envoltas por estroma altamente celular que forma elevações papilares (as palissadas de Vogt, segundo Townsend). O facto de as células na sua camada basal demonstrarem positividade para o factor de transcrição p63 e proteína transportadora ABCG2 é mais um elemento a favor da localização de células precursoras do epitélio corneano no limbo, sejam elas células amplificadoras transitórias ou células estaminais, hipótese

postulada pela primeira vez por Davanger e Evensen em 1971 (Davenger, 1971). Este facto está de acordo com as observações de outros autores que localizam estas células precursoras na camada basal do epitélio límbico (Schermer, 1986; Cotsarelis, 1989). Quanto às projecções focais estromais, a descrição feita pelos próprios autores é sobreponível à definição de palissada de Vogt: projecções estromais em dedo de luva rodeadas por uma camada compacta de células pequenas – e que corresponde à camada basal do epitélio límbico.

Clinicamente, a insuficiência límbica manifesta-se por defeitos epiteliais recorrentes e persistentes, inflamação crónica, neovascularização e invasão corneana do epitélio conjuntival (Figura 2.8), fenómeno conhecido como conjuntivalização (Dua, 2000). Na maioria dos casos é uma situação altamente incapacitante, com diminuição da qualidade de vida do doente, por comprometer a acuidade visual, fotofobia, blefarospasmo, lacrimação e episódios recorrentes de dor (Puangsricharern, 1995; Akpek, 1999; Dua, 2000).

O tratamento depende fundamentalmente da gravidade clínica e do atingimento ocular, uni ou bilateral (Dua, 2000; Ahmad, 2010).

A insuficiência límbica pode ser parcial ou total, classificação que determina o tipo de tratamento a instituir. Por norma, a insuficiência límbica parcial necessita de um tratamento tópico, mais conservador, com lágrimas artificiais e anti-inflamatórios. Em determinados casos de insuficiência parcial, como é o caso do pterigium grau II, III ou IV, necessitamos também da realização de transplante de limbo, por norma autotransplante, para resolução definitiva desta condição (Torres, 2005; Murta, 2005; Torres, 2008). Os casos graves de insuficiência límbica total bilateral, como por exemplo a aniridia ou as queimaduras químicas graves, constituem grandes desafios terapêuticos uma vez que necessitam sempre de um transplante de limbo alogénico.



(a)

(b)

Figura 2.8 – Insuficiência límbica em doente com aniridia: (a) iluminação difusa; (b) retroiluminação. Visível a neovascularização da córnea e a opacidade central. Imagens de doente observado na Secção de Córnea do CRIO – CHUC

Nas situações de insuficiência límbica parcial e doença unilateral, podemos efectuar um transplante autólogo. Nesta técnica efectuamos a excisão de cerca 5 mm² (1x5 mm) de limbo são, para doação de células estaminais, de forma a ser transportado para a zona que apresenta a insuficiência límbica localizada (Figura 2.9). Nestes casos a nossa taxa de sucesso é bastante boa, ocorrendo cerca de 3% de recidivas (Torres, 2008), valor que compara favoravelmente com o apresentado pela técnica convencional, onde as recidivas podem chegar até 82% (Hisrt, 2003). Apesar de tudo, está documentado o risco de insuficiência límbica iatrogénica na zona do limbo dador, uma vez que é excisado limbo numa extensão considerável (Dua, 2000; Espana, 2004; Nguyen, 2008). Este risco foi por nós estudado e os resultados são apresentado no capítulo Estudos Publicados deste trabalho.

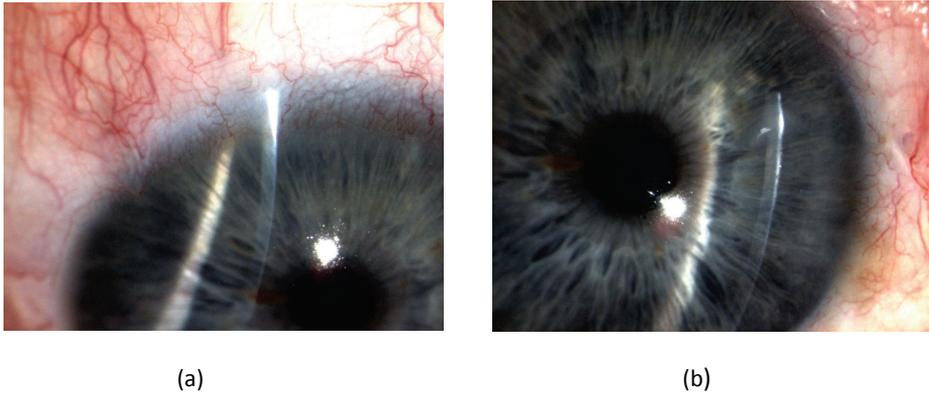


Figura 2.9 – Transplante autólogo limbo-conjuntival em doente que apresentava pterígio grau III. As imagens foram obtidas 9 meses após a cirurgia: (a) zona dadora na região límbica temporal superior sem insuficiência límbica; (b) zona de excisão do pterígio sem recidiva. CRIO – CHUC.

No alo-transplante límbico recorremos a limbo de dador vivo, por norma relacionado em termos familiares com o doente (Tsai, 1994; Tsubota, 1996) ou de dador cadáver (Holland, 1999; Daya, 2001). O alo-transplante apresenta uma elevada probabilidade de rejeição e falência, dada a presença de células de Langerhans e à natureza vascular do limbo, requerendo imunossupressão sistémica por longo prazo (Espana, 2004). De facto, os resultados a médio e longo prazo têm-se revelado decepcionantes, contrariando a expectativa inicialmente criada (Espana, 2004; Rosa 2008).

Pellegrini revolucionou a abordagem desta patologia, ao descrever pela primeira vez, o uso de células estaminais límbicas autólogas expandidas *ex vivo*, no tratamento de dois doentes com insuficiência límbica total unilateral (Pellegrini, 1997). Esta técnica permite obter enxertos com grande quantidade de células, a partir de uma pequena biópsia límbica de 1 mm^2 , minimizando o risco de insuficiência límbica da zona dadora. Para além disso, quando obtidos a partir de dador alógeno estes alo-transplantes serão menos imunogénicos, uma vez que, após a cultura, o número de células apresentadoras de antígeno se encontra diminuído (Auböck, 1988; Oh, 2010). Desde então, vários autores têm publicado a sua experiência com auto e alotransplantes de células cultivadas *ex vivo*, tanto a partir de dadores vivos relacionados, como de dadores cadáveres (Holland, 1996; Liang, 2009; Pauklin, 2010).

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

O transplante de células da mucosa oral expandidas *ex vivo* constitui uma variante desta técnica e tem sido utilizada com sucesso em algumas séries (Priya, 2011; Liu, 2011). De facto, a possibilidade de recorrer a fontes celulares alternativas, facilmente acessíveis, alarga o espectro de aplicação terapêutica desta técnica. A grande vantagem reside no facto de deixarmos de estar condicionados pela disponibilidade de tecido ocular autólogo. Nesta técnica são utilizadas células estaminais autólogas expandidas *ex vivo*, minimizando assim o risco de rejeição que apresentam os alo-enxertos límbicos.

2.3. IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

A microscopia confocal da córnea veio expandir a capacidade de avaliação da córnea normal e com patologia. Esta técnica revelou-se de grande utilidade na clínica, quer no diagnóstico de patologias, quer na monitorização de algumas terapêuticas instituídas. Tal resultou simplesmente do aumento da resolução espacial para além dos limites da biomicroscopia.

2.3.1. Córnea Normal

À excepção da membrana de Descemet, todas as camadas da córnea são visualizáveis *in vivo* através da MCC. A resolução e ampliação proporcionada pela MCC permite-nos a visualização das células da córnea, principalmente dos seus núcleos, devido à maior reflectividade destas estruturas, não possibilitando no entanto a observação de outros organelos. Seguidamente, descrevemos as características morfológicas das diferentes camadas da córnea, quando observadas por MCC.

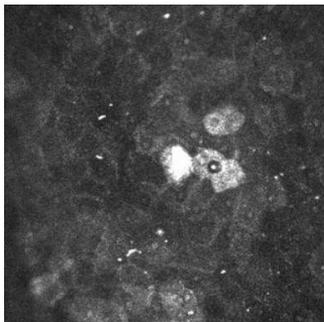
Epitélio corneano

Na MCC, as células superficiais (Figura 2.10a) medem cerca de 30 – 50 μm de comprimento e aproximadamente 5 μm de espessura (Masters, 1995). Estas células apresentam um aspecto poligonal, de bordos bem definidos e de diferentes tamanhos (Tomii, 1994). O núcleo destas células é bastante visível, relativamente pequeno, redondo e escuro, rodeado por anel escuro hipo-reflectivo perinuclear (Masters, 1995). O citoplasma destas células é altamente brilhante (Guthoff, 2009). As células superficiais apresentam grandes variações na reflectividade citoplasmática relacionadas com o processo de maturação e descamação (Wilson, 2000).

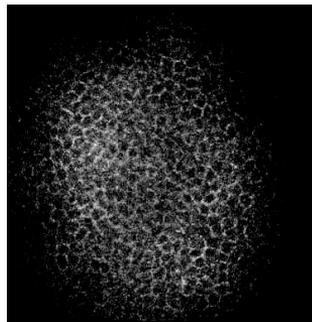
As células em asa localizam-se na zona intermédia do epitélio corneano e apresentam uma forma e tamanho variável, até 20 μm (Guthoff, 2006). A sua reflectividade é a mais baixa de todas as células da córnea (Masters, 1995). Estas células são caracterizadas pelo facto de apresentarem bordos bem definidos e

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

brilhantes. O núcleo destas células é difícil de distinguir e não apresenta o anel escuro que se observa nas células epiteliais superficiais (Masters, 1995).



(a)



(b)

Figura 2.10 – Epitélio corneano: (a) células epiteliais superficiais; (b) células epiteliais basais. Imagens obtidas com um microscópio confocal de varrimento laser (HRT II + RCM), CRIO – CHUC.

As células basais epiteliais (Figura 2.10b) apresentam cerca de 10–15 μm de diâmetro (Tomii, 1994) e formam um padrão em mosaico regular, com corpos celulares escuros e bordos brilhantes (Tomii, 1994; Wilson, 2000; Su, 2006). O núcleo destas células não se visualiza na MCC. A intensidade do brilho da parede destas células varia substancialmente.

Nervos corneanos

Devido ao seu tamanho relativamente pequeno raramente conseguimos visualizar os nervos epiteliais na MCC *in vivo*. No entanto, os nervos do plexo nervoso sub-basal (Figura 2.11a) são facilmente identificáveis (Müller, 2003). Na MCC, estes nervos apresentam-se como estruturas filiformes relativamente tortuosas, muito reflectivas, presentes sobre um fundo escuro. Podem ainda apresentar bifurcações em forma de Y ou T (Figura 2.11b) e fibras mais finas de conexão em forma de H (Figura 2.11c), características confirmadas por microscopia electrónica (Muller, 1996). A MCC permite observar as varicosidades que muitos destes nervos apresentam (Oliveira-Soto, 2001) e que foram identificadas como axónios eferentes e terminais sensoriais

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

(Muller, 2003) e correspondem a acumulações de mitocôndrias e glicogénio (Rozsa, 1982). Estudos mais recentes, recorrendo à montagem de imagens obtidas para diferentes regiões do plexo sub-basal, mostraram que a arquitetura do plexo nervoso sub-basal apresenta uma disposição radiária dos troncos nervosos, que convergem para uma região central aproximadamente 1–2 mm inferior ao ápex da córnea (Patel DV, 2005).

Apesar da sua densidade ser substancialmente menor que a dos nervos do plexo sub-basal, os nervos estromais são facilmente visualizados, uma vez que se apresentam relativamente largos na MCC (Figura 2.11b). Possuem um aspecto rectilíneo altamente reflectivo e podem apresentar bifurcações (Oliveira-Soto, 2001; Muller, 2003). A sua quantificação é difícil, não só devido à sua baixa densidade, mas também porque atravessam várias secções ópticas, sendo difícil acompanhar o seu percurso nas imagens de MCC (Müller, 2003). Os nervos estromais surgem no estroma anterior sendo mais difíceis de encontrar no estroma médio e estão ausentes no estroma posterior (Muller, 1995).

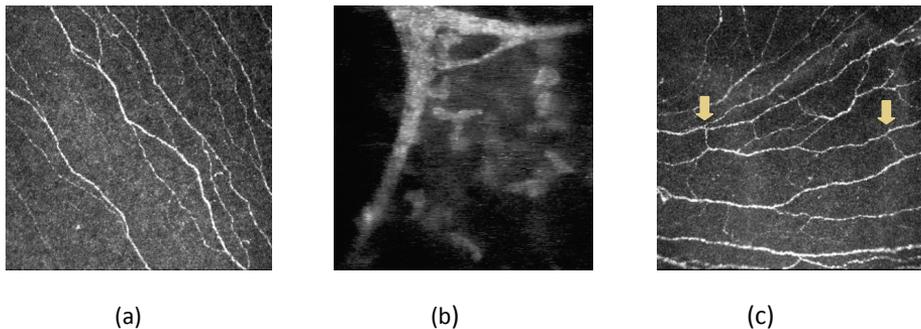


Figura 2.11 – Nervos corneanos: (a) plexo nervoso sub-basal; (b) nervo corneano com bifurcação em Y no estroma médio; (c) bifurcações em H em nervos do plexo sub-basal. CRIO – CHUC.

Camada de Bowman

Na MCC *in vivo*, a localização da camada de Bowman define-se pela presença do plexo sub-basal (Guthoff, 2006). Embora sendo uma camada acelular, tem sido referida a presença de células de Langerhans nesta camada, em indivíduos normais e

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

com patologia nomeadamente associadas ao plexo sub-epitelial. Estas células são observáveis por MCC (Rosenberg, 2002; Popper, 2005; Zhivov, 2005) onde se apresentam com o aspecto de corpúsculos brilhantes com diâmetro até 15 µm e sob três formas distintas: corpos celulares individuais sem prolongamentos citoplasmáticos, células com prolongamentos dendríticos e células dispostas numa rede secundária formada pela interdigitação de processos dendríticos longos. As células de Langerhans podem apresentar-se de grande tamanho com prolongamentos longos ou de pequeno tamanho e sem prolongamentos dendríticos, sendo que estas surgem apenas no centro da córnea. Esta diferença está provavelmente relacionada com o estado de maturação destas células (Zhivov, 2005; Zhivov, 2007).

Estroma corneano

No estroma corneano, para além de alguns nervos, a MCC permite apenas visualizar os núcleos dos queratócitos, não possibilitando a observação do citoplasma destas células e das fibras de colagénio (Bohnke, 1999; Jalbert, 2003). A forma e o arranjo espacial dos queratócitos varia de acordo com diferentes zonas do estroma: anterior, médio ou posterior (Berlau, 2002; Patel SV 1999; Patel SV, 2001).

No estroma anterior (Figura 2.12a), os núcleos dos queratócitos apresentam menores dimensões que nas outras camadas, são mais brilhantes, bastante mais numerosos e possuem uma morfologia multiangulada característica.

No estroma médio os queratócitos apresentam uma densidade menor e o seu núcleo é mais regular, por norma com aspecto mais ovalado (Su 2006) e com indentações ocasionais (Erie, 2003).

No estroma posterior (Figura 2.12b), considerado uma zona reduzida imediatamente adjacente à membrana de Descemet (uma ou duas imagens consecutivas) (Erie, 2003), os queratócitos são mais alongados que no restante estroma e muitas vezes com aspecto em agulha (Berlau, 2002; Wilson, 2000; Bourne, 2003).

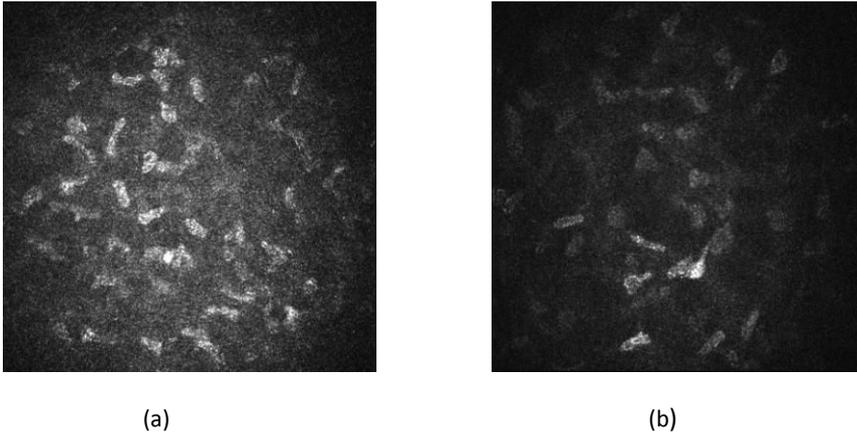


Figura 2.12 – Estroma corneano e queratócitos: (a) estroma anterior; (b) estroma posterior. CRIO – CHUC.

Estudos de MCC revelaram que o núcleo dos queratócitos apresenta aspecto diferente de acordo com o estadió de proliferação (Erie, 1999; Patel SV, 2001; Berlau 2002). Os queratócitos quiescentes ou inactivos apresentam núcleos brancos, ovalados ou em forma de feijão sobre um fundo escuro, não se visualizando os prolongamentos celulares (Mustonen, 1998a; Prydal, 1998; Patel SV, 2001). Os fibroblastos activados ou em proliferação, o que implica síntese proteica, adquirem uma forma mais larga e brilhante, sendo possível na maioria das situações observar os seus prolongamento celulares (Moller-Pedersen, 1998; Bourne, 2001; Mitooka, 2002).

A medição da densidade de queratócitos nas diferentes zona do estroma da córnea central é a avaliação quantitativa mais frequente nos estudos de MCC *in vivo*. Trata-se de um tema extensamente estudado por nós e que será discutido ao longo deste trabalho.

Membrana de Descemet

A membrana de Descemet não se visualiza nas pessoas mais jovens, tornando-se mais evidente com a idade. O que por norma se observa, é uma camada acelular entre o estroma posterior e o endotélio (Hollingsworth, 2001). Na MCC *in vivo*, a membrana de Descemet é definida opticamente pela fácil identificação das células endoteliais (Guthoff, 2006).

Endotélio corneano

Ao examinarmos o endotélio por MCC, este surge-nos com o padrão hexagonal típico da disposição das células endoteliais (ver Figura 2.13), idêntico ao observado por microscopia especular. Estas células apresentam citoplasma brilhante e paredes celulares escuras (Guthoff, 2006). Normalmente os núcleos não são visíveis. Vários estudos de MCC confirmaram uma diminuição significativa da densidade das células endoteliais com a idade (Berlau, 2002), referindo valores 0.33% por ano (Bourne, 2003). Da mesma forma é referenciado o aumento do polimegatismo endotelial com a idade (Bourne, 2003).

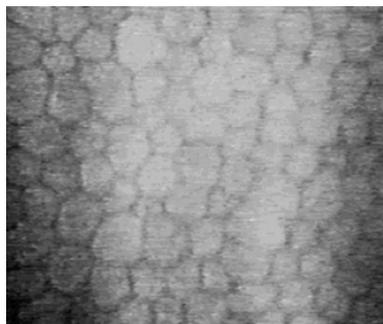


Figura 2.13 – Endotélio corneano. CRIO – CHUC.

2.3.2. Aplicação na Clínica

A MCC teve um impacto muito significativo no diagnóstico e na avaliação da terapêutica de diferentes patologias corneanas. Um dos maiores impactos adveio da capacidade da MCC para avaliar o endotélio mesmo na presença de edema corneano ou de opacidades moderadas, avaliação extremamente difícil por biomicroscopia e por microscopia especular.

A MCC *in vivo* foi amplamente utilizada no estudo de distrofias corneanas como a distrofia endotelial de Fuchs (Mustonen, 1998a; Chiou, 2006; Alomar, 2011; Hecker, 2011; Schrems-Hoesl, 2013), distrofias da membrana basal (Hau, 2011; Kobayashi, 2012A), distrofia de Fleck (Frueh, 2003; Holopainen, 2003; Banning, 2006), distrofia de Bietti, (Bozkurt, 2010), bem como outro tipo de distrofias (Traversi, 2006; Jing, 2009;

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

Rasnu, 2010; Pellistri, 2010; Weiss, 2011; Kurbanyan, 2012; Shukla, 2012). As imagens obtidas por MCC, como as apresentadas na Figura 2.14 para a distrofia de Fuchs, correlacionam com os achados convencionais da biomicroscopia, com a MCC a proporcionar maior detalhe, principalmente a nível das alterações epiteliais e estromais e plexo nervoso.

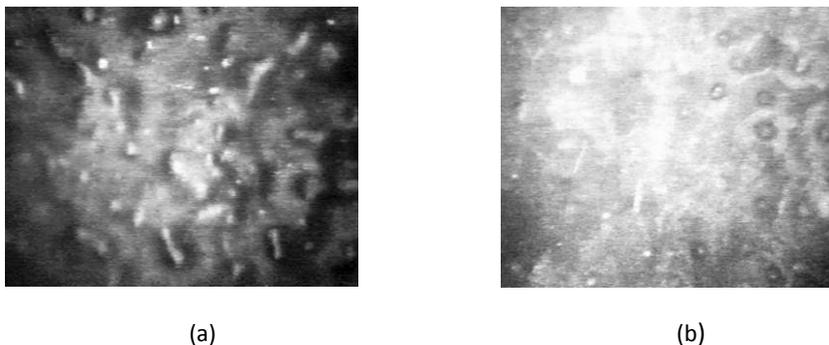


Figura 2.14 – *Guttatas* na distrofia de Fuchs. CRIO – CHUC.

Particularmente na avaliação do síndrome de olho seco, foram publicados vários estudos de MCC *in vivo* referentes às alterações do filme lacrimal (Stonecipher, 2007) e da regeneração do epitélio corneano (Ban, 2011; Villani, 2011) (Figura 2.15a), alterações dos nervos corneanos (Figura 2.15b) (Benítez-Del-Castillo, 2007; Alhatem, 2012; Labbé, 2012), e ainda o aparecimento de neovascularização (Figura 2.15c) (Vera, 2009). A MCC é um método excelente para o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos desta doença ao permitir a detecção e quantificação das alterações epiteliais, células inflamatórias e imunes, nervos corneanos, queratócitos e avaliação das glândulas de Meibomius. Pela capacidade de visualização de achados subclínicos, podemos estratificar precocemente os doentes, o que nos parece uma mais valia para o planeamento e realização de ensaios clínicos. Ao proporcionar uma terapia imagem-guiada, baseada nas alterações celulares, a MCC é um método objectivo de monitorização da eficácia do tratamento, que por norma é baseada exclusivamente em sinais clínicos.

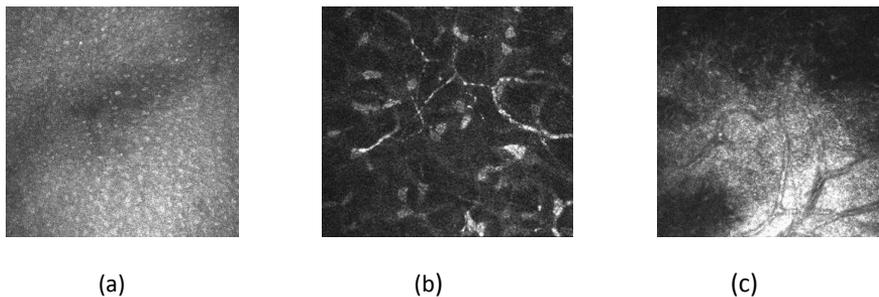


Figura 2.15 – Síndrome de olho seco: (a) metaplasia corneana. observa-se aumento do tamanho celular, activação nuclear e diminuição do relação núcleo/citoplasma; (b) tortuosidade anormal dos nervos corneanos; (c) neovasos. CRIO – CHUC.

A MCC foi ainda utilizada na avaliação de patologias que induzem depósitos corneanos como a queratopatia induzida pela amiodarona, (ver Figura 2.16) (Ciancaglini, 2001), a gamapatia monoclonal (Paladini, 2013), a cistinose (ver Figura 2.17) (Tavares, 2009; Labbé, 2009), as quinolonas (Awwad, 2004), as amiloidoses (Kaukman, 95; Rosenberg, 2001; Woodward, 2007; Patel DA, 2010) e ainda em situações mais raras como depósitos de prata (Sánchez-Pulgarín, 2010) ou de cloroquina (Ma, 2012). Nestas situações detectam-se partículas anormais nas diferentes camadas corneanas, por norma associadas a queratócitos hiperreflectivos. Na queratopatia por cloroquina as fibras nervosas do plexo sub-basal apresentam-se mais tortuosas e com um maior número de varicosidades. Os nervos do estroma exibem maior número de ramificações.

Múltiplos estudos de MCC foram publicados na avaliação pós-operatória de doentes submetidos a cirurgia refractiva por laser, quer LASIK - *laser in situ keratomileusis*, quer PRK - *photorefractive keratectomy* (Linna, 1997; Sonigo, 2006; Amoozadeh, 2009; Patel SV, 2010; Chen, 2011). A MCC revelou-se útil na avaliação da espessura do lenticulo (Randleman, 2012), da regeneração nervosa, de partículas na interface lenticular (Figura 2.18), da queratite lamelar difusa (ver Figura 2.19) (Kymionis, 2007; Wheeldon, 2008) e na avaliação da densidade dos queratócitos. Um estudo com 2 anos de evolução pós LASIK (Moilanen, 2008), concluiu que a densidade dos queratócitos no estroma anterior é menor que nos indivíduos normais, o mesmo acontecendo com a densidade dos nervos sub-basais. Foi ainda estudado o implante de lentes intra corneanas para o tratamento da presbiopia com referências à

deposição de ferro ao redor destes implantes e à activação dos queratócitos do estroma anterior (Ismail, 2004; Lindsey, 2007; Dexl, 2011).

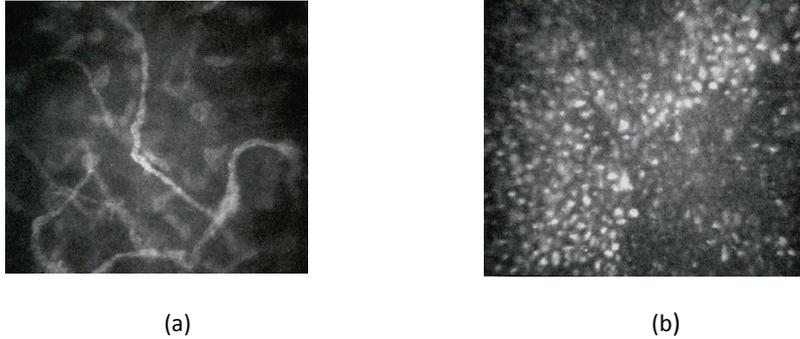


Figura 2.16 - Queratopatia induzida pela amiodarona estadio 3: (a) nervos estromais com morfologia irregular; (b) epitélio basal com depósitos intracelulares brilhantes, hiper-reflectivos. CRIO – CHUC.

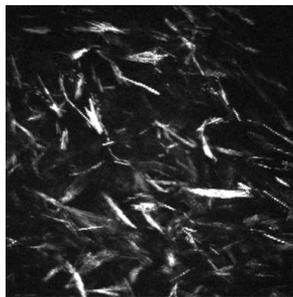


Figura 2.17 - Cristais de cistina no estroma anterior da córnea. CRIO – CHUC.

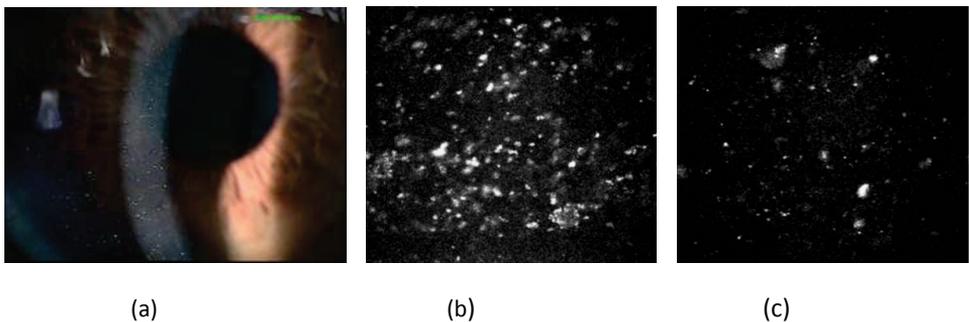


Figura 2.18 – LASIK: (a) exame de biomicroscopia em que se visualizam partículas na interface do lenticulo; (b) exame de microscopia confocal aos 8 dias e (c) aos 3 meses. CRIO – CHUC.

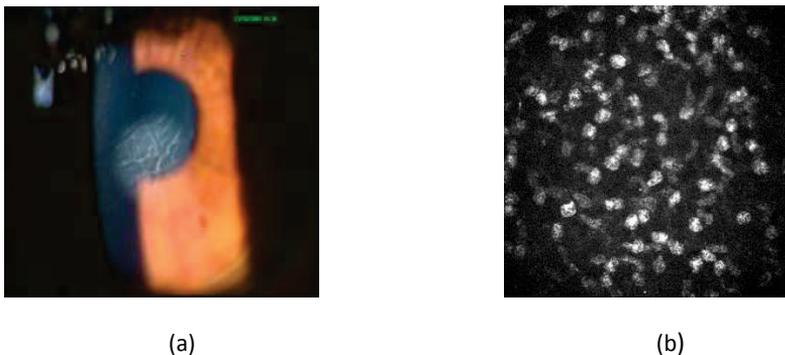
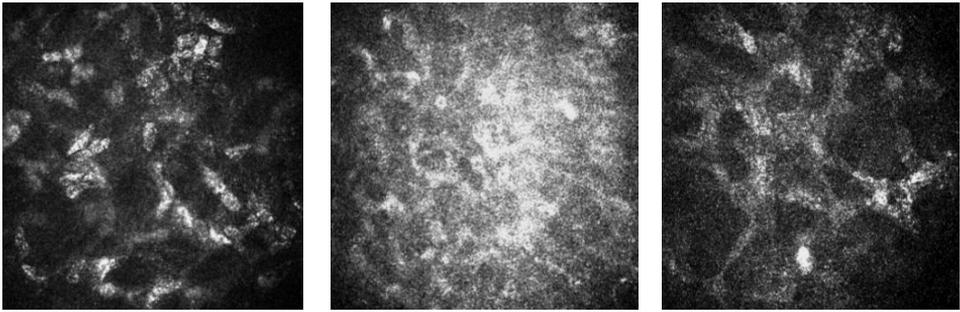


Figura 2.19 – Queratite lamelar difusa estadio 3: (a) exame de biomicroscopia; (b) exame de microscopia confocal em que se visualizam células redondas/ovais e núcleos excêntricos hiper-reflectivos. CRIO – CHUC.

A queratoplastia, penetrante ou lamelar anterior e posterior, foi amplamente estudada pela MCC (Mazzotta, 2007; Abdelkader, 2010; Seery, 2011; Morishige, 2012; Anshu, 2012). Como se verifica na Figura 2.20, no pós-operatório imediato observam-se queratócitos activados, com distribuição segundo padrão em favo de mel, e a presença de *haze* acentuado. Ao terceiro mês verifica-se frequentemente a manutenção da activação dos queratócitos que permanecem organizados segundo o referido padrão. Consta-se ainda uma diminuição significativa da densidade dos queratócitos em todas as camadas estromais, bem como a presença de fibras nervosas mais finas, curvilíneas e com ramificações anormais (Figura 2.21). Estes estudos permitiram concluir que a arquitetura normal dos nervos corneanos está ausente mesmo após a recuperação da sensibilidade corneana (Stachs, 2010).

Um dos tratamentos mais recentes do queratocone é o “*cross-linking*” (CXL) do colagénio da córnea induzido pela estimulação da riboflavina pelos radiação ultravioleta-A. A MCC apresenta um grande potencial na avaliação da cicatrização neste tratamento e foi amplamente utilizada para este fim (Mazzotta, 2008; Croxatto, 2010; Kymionis, 2010; Kaya, 2011). Os estudos concluíram que ocorre regeneração completa do epitélio duas semanas após o tratamento. O estroma anterior apresenta um aspecto em favo de mel, mas sem qualquer alteração do endotélio. Está documentada a recuperação total do estroma aos seis meses de pós-operatório (Figura 2.22) (Knappe, 2011; Touboul, 2012).

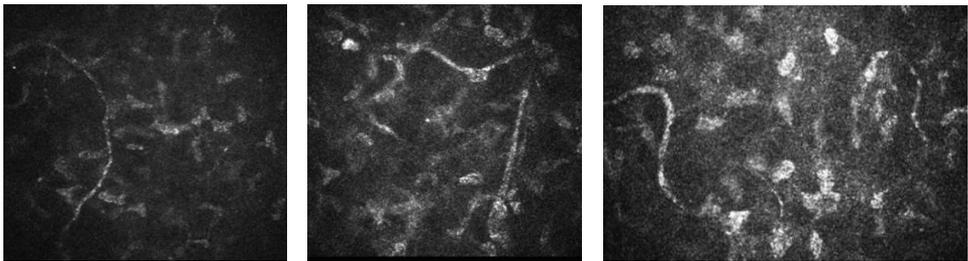


(a)

(b)

(c)

Figura 2.20 - Queratoplastia penetrante: no terceiro dia de pós-operatório podemos observar (a) queratócitos activados e (b) *haze* acentuado. Aos 3 meses podemos observar ainda um padrão em favo de mel (c). CRIO - CHUC

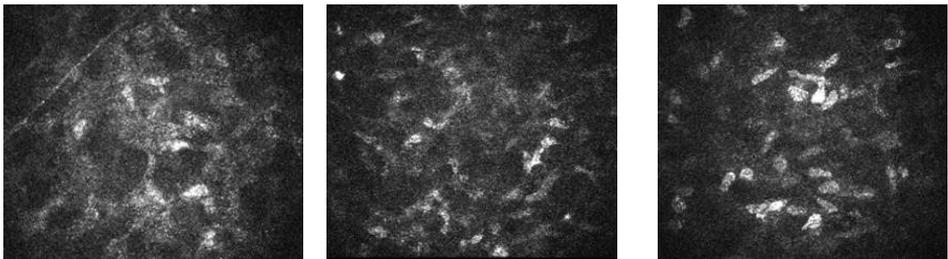


(a)

(b)

(c)

Figura 2.21 - Regeneração dos nervos corneanos sete anos após queratoplastia penetrante: (a) fibra nervosa fina; (b) e (c) fibras com tortuosidade aumentada. CRIO – CHUC.



(a)

(b)

(c)

Figura 2.22 - *Crosslinking* da Córnea: (a) no primeiro mês observa-se diminuição da densidade dos queratócitos e edema; (b) aos 3 meses verifica-se o início da repopulação do estroma pelos queratócitos e *haze* sub-clínico; (c) aos 6 meses a densidade de queratócitos é normal, embora se observem ainda alguns queratócitos activados. CRIO – CHUC.

Ainda em patologias como a queratopia da aniridia, a MCC revelou que, num estadio precoce, ocorrem alterações das fibras nervosas sub-basais, infiltração do

AValiação MICROESTRUTURAL DA CórNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

epitélio central da córnea por células dendríticas, instabilidade do filme lacrimal, aumento da espessura corneana e alterações da arquitetura normal das palissadas de Vogt (Eden, 2012). No Síndrome Ehlers-Danlos, a MCC demonstrou diminuição da densidade das células epiteliais e uma densidade maior nos queratócitos do estroma anterior e posterior (Gharbiya, 2012).

O implante de anéis intraestromais é uma técnica de excelência na melhoria da acuidade visual em determinados tipos de queratocone e na ectasia pós-cirúrgica (ver Figura 2.23). A MCC *in vivo* foi utilizada na avaliação pós-operatória do implante destes anéis intraestromais (Quadrado, 2002b; Kymionis, 2006) e de uma forma particular, foram estudados os depósitos localizados no canal de implante do anel e no estroma adjacente (Ly, 2006).

Na literatura encontramos vários exemplos de estudos referentes a queratites infecciosas e não infecciosas como é o caso da queratite puncteada de Thygeson (Kobayashi, 2011). A característica fundamental nesta queratite são os múltiplos agregados de depósitos altamente reflectivos, localizadas a nível do epitélio superficial e basal e que correspondem às lesões puncteadas superficiais que aparecem na biomicroscopia. O *haze* sub-epitelial surge sempre neste tipo de queratite, embora a presença de células de Langerhans seja esporádica a nível das células basais do epitélio. Na queratopatia tóxica central (Hsu, 2011) observa-se edema e rearranjo das fibras de colagénio, com infiltração de elementos reflectivos semelhantes em aparência a imunoglobulinas (Hsu, 2011; Thornton, 2012). Em doenças ulcerativas periféricas, como a úlcera de Mooren, a MCC disponibilizou parâmetros de avaliação do grau de inflamação e eficácia de tratamento (Hatou, 2011). Estes estudos baseiam-se na capacidade desta técnica para detectar neutrófilos, células dendríticas e linfócitos e contribuem para um melhor conhecimento desta patologia.

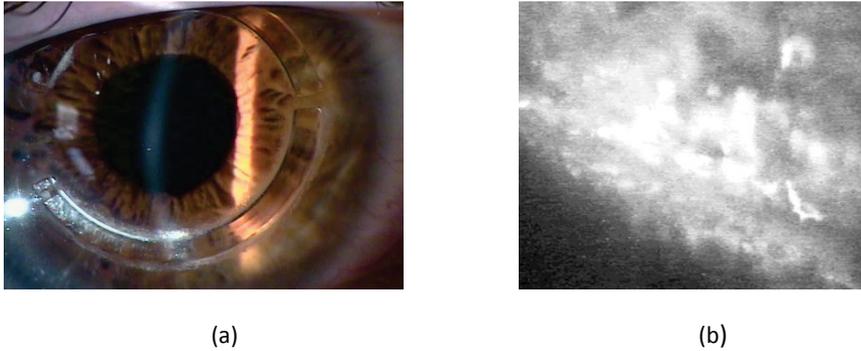


Figura 2.23 – (a) anéis intraestromais aos 8 meses de pós operatório; (b) a MCC demonstra a presença de depósitos no canal do anel e no estroma circundante. CRIO - CHUC

A queratite herpética foi alvo de vários estudos relativos às alterações dos nervos corneanos (Hamrah, 2013) e à componente inflamatória (Mocan, 2012) desta doença. Constatou-se a infiltração epitelial por células inflamatórias do tipo dendrítico, envolvimento estromal sob a forma de infiltrados focais e difusos, diminuição da densidade dos nervos do plexo sub-basal e perda de células endoteliais. As queratites por citomegalovírus e por adenovírus foram também avaliadas por MCC (Knappe, 2005; Dosso, 2008; Kobayashi, 2012b). Na queratite por adenovírus constatou-se a activação das células dendríticas desde o início da doença, com atingimento massivo do epitélio e das zonas mais profundas do estroma por células inflamatórias que se mantêm durante longo tempo.

A MCC é extremamente útil no diagnóstico de queratites infecciosas atípicas, pois permite inferir o diagnóstico pela presença de sinais imagiológicos, processo muito mais rápido que as convencionais culturas de fungos e de acantamoeba. O diagnóstico clínico diferencial na queratite por acantamoeba é particularmente difícil, principalmente em relação à queratite herpética. Neste aspecto, a MCC contribui para um diagnóstico mais precoce ao permitir a visualização dos trofozoitos e a dupla parede dos quistos (Figura 2.24), como também demonstrámos (Kaufman, 2004; Chiou, 2006; Costa, 2009; Kumar, 2010; Mauger, 2010; Clarke, 2012; Yokogawa, 2012; Kurbanyan, 2012; Marques, 2012). Uma vez que esta patologia implica tratamentos prolongados, a MCC desempenha um papel de grande relevância na monitorização da

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

terapêutica, uma vez que é um exame rápido e não-invasivo, que pode ser repetido sempre que necessário.

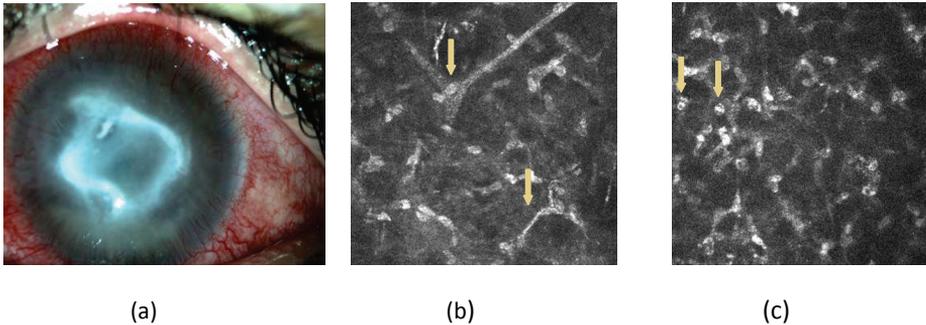


Figura 2.24 - Queratite por Acanthamoeba: (a) imagem de biomicroscopia mostrando o infiltrado estromal em anel; (b) – queratonevrite radiária e células dendríticas; (c) quistos no estroma anterior. CRIO – CHUC.

Estudos com MCC revelaram elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico da queratite fúngica (Kanavi, 2007; Chiou, 2006; Das, 2009). Na MCC, os fungos são caracterizados pela hiper-reflectividade e estrutura filamentosa como sucede no caso do *Fusarium* (Labbé, 2011), ou sob a forma de opacidades intra-epiteliais, como acontece na infecção por *microsporidium* (Figura 2.25) (Shi, 2008; Costa 2009; Takezawa, 2010). A avaliação da eficácia terapêutica dos antifúngicos pode ser realizada por MCC, como demonstra um estudo em que se quantificou, ao longo do tempo, a densidade de hifas e de células inflamatórias e as alterações morfológicas dos queratócitos (Shi, 2008).

Na literatura encontramos ainda vários outros estudos referentes à avaliação da eficácia terapêutica por MCC. São exemplos o tratamento da síndrome de olho seco (Monaco, 2011; Hovakimyan, 2012; Fogagnolo, 2013), o tratamento do carcinoma de células epiteliais da conjuntiva com 5-fluoracilo (Parrozzani, 2011), a utilização de mitomicina C tópica durante o tratamento cirúrgico do pterígio e na cirurgia PRK (Zhivov, 2009; Huisingh, 2012; Coelho, 2007). No caso particular do PRK constata-se que a utilização tópica de mitomicina C 0.02% durante um tempo máximo de 15 segundos não afecta a densidade das células endoteliais (Diakonis, 2007) e não induz alterações nos queratócitos quando comparada com o PRK *standard* (Midena, 2007).

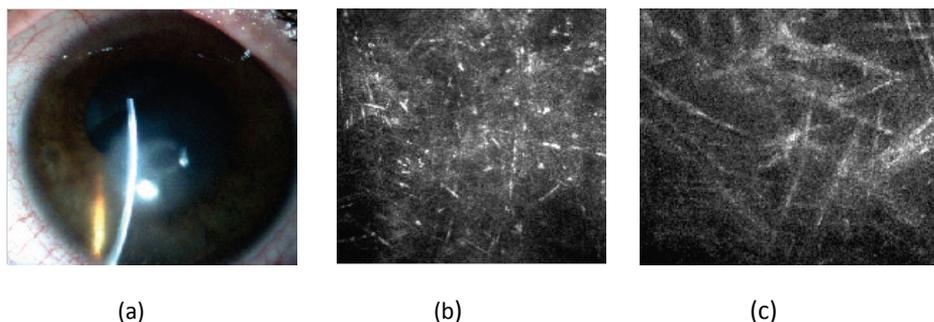


Figura 2.25 - Queratite fúngica: (a) biomicroscopia; (b) hifas, filamentos hiper-reflectivos com 4-8 μm de espessura; (c) hifas. CRIO – CHUC.

2.4. QUANTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS CORNEANAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Quando iniciámos os estudos que conduziram a este tese, a grande maioria das publicações científicas relativas à MCC *in vivo* referiam-se a estudos qualitativos.

A primeira observação da espessura total da córnea humana, por microscopia confocal da córnea, foi realizada *in vitro* em 1985 (Lemp, 1985), utilizando um microscópio do tipo *tandem scanning* baseado na utilização de discos de Nipkow para a realização dos orifícios confocais, resultado de uma sucessão de desenvolvimentos a partir do trabalho original de Petran (Petran, 1968). Após aprovação deste microscópio para uso clínico pela FDA em 16 de Dezembro de 1992, este tornou-se o primeiro microscópio confocal da córnea disponível comercialmente. Inicialmente foi comercializado pela empresa Tandem Scanning Corporation (Reston, VA, EUA) e posteriormente pela empresa Advanced Scanning Corporation (New Orleans, LA, EUA). Actualmente já não é comercializado.

Em 1994 surgia a primeira observação *in vivo* da córnea humana com base num microscópio confocal de varrimento de fenda (*scanning-slit*), desenvolvido por Thayer (Masters, 1994), resultado de uma sucessão de desenvolvimentos tecnológicos a partir do trabalho de Svishchev, nos finais dos anos sessenta do século vinte (Svishchev, 1969). O conceito de microscópio confocal de varrimento de fenda foi adoptado por vários fabricantes, sendo produzidos diversos modelos como o Confoscan: Confoscan

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

2.0 e Confoscan P4 (Fortune Technologies, Vigonza, Itália e posteriormente Tomey Corporation, Cambridge, MA, EUA) e o Microphthal (Helmut Hund, Lt., Wetzlar, Alemanha). A Tomey obteve aprovação da FDA para o Confoscan em 14 de Agosto de 1997. Actualmente, a família Confoscan é propriedade da Nidek (Nidek Technologies, Gamagori, Japão) que, depois do modelo Confoscan 3, comercializa agora o Confoscan 4.

Um terceiro tipo de microscópio confocal da córnea foi desenvolvido por Guthoff na Universidade de Rostock sobre a forma de um módulo óptico (Rostock Cornea Module) que, quando instalado num tomógrafo de varrimento laser comercial (Heidelberg Retinal Tomograph HRT II) desvia o foco do laser do plano da retina para o plano da córnea, permitindo a observação das suas diferentes camadas (Stave, 2002). Este instrumento é actualmente comercializado pela Heidelberg Engineering (Heidelberg, Alemanha).

Como facilmente se verifica, os microscópios confocais da córnea comerciais atrás descritos chegaram à clínica em épocas distintas. As primeiras utilizações clínicas da microscopia confocal da córnea, baseadas em observações qualitativas, tiveram por base o microscópio *tandem scanning*. A adopção de métodos quantitativos foi realizada com os instrumentos produzidos pelas empresas Tandem Scanning Co, Tomey, Fortune Technologies e Hund. A estes juntou-se um pouco mais tarde o microscópio da Heidelberg Engineering (aprovado pela FDA em 22 de Outubro de 2004).

A primeira referência na literatura relativamente à observação *in vivo* da córnea humana por microscopia confocal, data de 1990 (Cavanagh, 1990). Tratou-se de um estudo totalmente qualitativo realizado em humanos saudáveis que incluiu ainda o estudo de processos de cicatrização em córneas de animais. Após a publicação por diversos autores de vários estudos realizados em coelhos, Cavanagh *et al.* publicaram em 1993 aquela que é possivelmente a primeira publicação completa (i.e. excluindo sumários de conferências) com observações *in vivo* da córnea humana por microscopia confocal (Cavanagh, 1993). O seu objectivo era, nas palavras dos autores, introduzir nos oftalmologistas os princípios ópticos e as imagens produzidas por um microscópio

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

confocal *tandem scanning* que tinha sido recentemente aprovado para uso clínico geral pela FDA. Neste trabalho, os autores apresentaram as suas observações de 9 indivíduos, nomeadamente os achados anatómicos normais. É referida a observação das células epiteliais superficiais e epiteliais basais, do plexo nervoso sub-basal e dos queratócitos do estroma, referindo-se aqui que apenas o núcleo destas células é observável. A observação dos processos de interconexão de queratócitos, em situações patológicas é mencionada. Embora sem quantificar, os autores referem que o número de queratócitos no estroma anterior é muito superior ao observado no estroma médio e no estroma posterior. É referida ainda a observação de nervos no estroma. Quanto ao endotélio corneano, apenas a indicação que o seu aspecto é idêntico ao observado através de microscopia especular.

O artigo apresenta ainda as observações ao nível celular do processo de cicatrização num doente submetido a PRK, bem como os achados em diferentes patologias: distrofia granular, distrofia de Reis-Buckler, erosão por lentes de contacto, queratite herpética, síndrome endotelial iridocorneal. São ainda apresentados resultados *ex vivo* em córneas de porcos infectadas com *acanthamoeba castellanii*.

Quase simultaneamente, surge nas actas da conferência SPIE Ophthalmic Technologies III (Janeiro de 1993) o primeiro artigo em que é descrita a observação *in vivo* da córnea humana por um microscópio confocal de varrimento de fenda, (Masters, 1993) baseado numa técnica que não implica contacto entre a objectiva e a córnea e conseqüente aplanção da córnea. Neste trabalho, para além da observação das estruturas corneanas observadas no artigo de Cavanagh, refere-se pela primeira vez a observação das células em asa, possível graças à melhor resolução e contraste proporcionados pela tecnologia de varrimento de fenda (Cavanagh, 1993). No ano seguinte, estes resultados foram apresentados em revista (Masters, 1994).

A partir daqui começam a aparecer outros estudos a descrever córneas observadas mas sem proceder a qualquer quantificação. Um modelo diferente de microscópio confocal de varrimento de fenda, com aplanção da córnea, foi apresentado por Koester *et al.* (Koester, 1993), tendo sido empregue para estudar as estruturas da córnea saudável, repetindo-se a observação das células em asa. Ainda

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

em 1993, é reportada a utilização da microscopia confocal da córnea no diagnóstico de um caso avançado de distrofia de Fuchs (Kaufman, 1993). Em 1994 e 1995, são publicados as primeiras observações relativas ao uso da microscopia confocal da córnea no diagnóstico da queratite por acantamoeba (Auran, 1994; Winchester, 1995). A observação *in vivo* de depósitos de amiloidose é publicada em 1995 (Kaufman, 1995). No mesmo ano é reportada a observação *in vivo* de depósitos de ciprofloxacina (Essepian, 1995). No ano seguinte assinala-se a utilização da microscopia confocal da córnea no diagnóstico da queratite fúngica por microsporos (Shah, 1996) e a primeira publicação num tema em que a utilização da microscopia confocal da córnea seria muito fértil: a avaliação da cirurgia refractiva (Corbett, 1996). É a partir de 1996 que se regista um grande aumento nas publicações relativas à utilização da microscopia confocal da córnea para observações qualitativas das mais variadas patologias da córnea.

Data de 1994 a primeira publicação que inclui medidas quantitativas de córnea humana obtidas *in vivo* por microscopia confocal (Tomii, 1994). Os autores estudaram córneas saudáveis, obtendo imagens das células epiteliais superficiais e basais a partir das quais mediram, utilizando um digitalizador, as áreas das referidas células, apresentando ainda a razão entre as áreas das células superficiais e basais. A análise das células epiteliais superficiais e a avaliação quantitativa da sua função como barreira entre o filme lacrimal e o ambiente celular interno da córnea foi o objecto de outro trabalho (Beuerman, 1994). Aqui utilizaram-se técnicas de processamento de imagem para localizar de forma automática os núcleos das células superficiais e determinar a distância ao vizinho mais próximo. Os autores mostraram que a distribuição destas distâncias é representável por uma distribuição gama, cujos parâmetros (forma e escala) podem ser utilizados para detectar situações de perda de células superficiais.

A observação e quantificação *in vivo* do movimento de células da córnea foram publicadas em 1995 (Auran, 1995). Neste trabalho, utilizaram um microscópio confocal de varrimento de fenda com uma objectiva de grande abertura numérica (0.75) que lhes permitiu observar ao longo do tempo células basais epiteliais, células

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

em asa e células que afirmaram ser possivelmente células de Langerhans e, assim, acompanhar sua a velocidade e a trajectória.

Devido à sua estrutura regular, o endotélio da córnea foi, juntamente com a camada basal epitelial e exactamente pelas mesmas razões, o alvo das primeiras tentativas de quantificação da densidade celular por análise automática de imagens obtidas por microscopia confocal da córnea. O primeiro trabalho relativo às células endoteliais foi apresentado no início de 1996 (Laird, 1996). Os autores apresentaram um método baseado em técnicas de filtragem digital de imagem e em operações morfológicas que permitia a detecção automática das fronteiras das células e sua posterior contagem. Através dos histogramas de tamanho celular extraia-se informação sobre variações na densidade celular e a perda de células. O método foi avaliado por comparação com a contagem manual das células tendo os autores reportado diferenças inferiores a 3%.

No início de 1996 foi também publicado um artigo relativo a uma alteração na configuração do microscópio confocal *tandem scanning* que viria a ter um impacto considerável nas medições quantitativas por microscopia confocal da córnea (Petroll, 1996). Os autores apresentaram um novo sistema que permitia calcular e registar em contínuo a posição do plano focal do microscópio. Esta posição corresponde à profundidade da região observada da córnea. Este sistema, que foi validado comparando as medições de espessura da córnea, obtidas por microscopia confocal, com as obtidas por paquimetria, baseava-se numa objectiva em que a posição do plano focal relativamente à sua extremidade, movimentando uma lente interna da objectiva. Este movimento era controlado por um codificador que fornecia a informação da posição do plano focal. Desta forma, passava a ser possível adquirir de forma automática um volume de imagens que cobria toda a espessura da córnea, com indicação da profundidade (localização axial) de cada imagem. Este dispositivo, que permaneceu durante vários anos um exclusivo dos microscópios *tandem scanning* veio a fomentar um debate entre os que defendiam que a sua presença era necessária para saber que região do estroma da córnea se estava a observar, e os que afirmavam ser

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

possível distinguir entre estroma anterior, médio e posterior apenas com base em características morfológicas das imagens.

Um dos primeiros trabalhos em que foi utilizada a inovação descrita no parágrafo anterior envolveu a medição da espessura do epitélio e a diminuição da espessura do estroma após queratotomia fotorefractiva (Moller-Pedersen, 1997). Para tal, os autores utilizaram a metodologia quantitativa que apresentaram numa outra publicação (Li HF, 1997). As medições de espessuras de camadas da córnea são realizadas fazendo com que o plano focal do microscópio varra axialmente a córnea, a velocidade constante. Uma vez que o microscópio associa a cada imagem um valor de profundidade, é possível obter perfis de intensidade a partir dos valores médios dos píxeis de uma região central de cada imagem. Os picos desta curva são correlacionados com as camadas corneanas por observação das imagens correspondentes às suas coordenadas axiais. Os resultados obtidos foram validados por comparação com paquimetria. As reprodutibilidades para as camadas superficial, basal epitelial e para a espessura total da córnea foram 3.2 μm , 2.3 μm e 10.0 μm , respectivamente.

As primeiras medições *in vivo* da densidade de queratócitos no estroma foram realizadas por Prydal (Prydal, 1998) e por Stave (Stave, 1998). O primeiro trabalho confirmou os achados histológicos anteriores, em que se observou a densidade máxima de queratócitos imediatamente a seguir à camada de Bowman. Contudo, os autores apresentam os resultados como densidades superficiais, não tendo utilizado métodos de estereologia para obter densidades volumétricas. Tendo o estroma da córnea uma espessura muito maior do que a resolução axial dos microscópios confocais da córnea, a apresentação de densidades superficiais não é a opção mais correcta, justificando-se a medição de densidades volumétricas.

O trabalho de Stave *et al.* (Stave, 1998) apresenta aspectos inovadores. Por um lado foi utilizado um dispositivo de sucção para estabilizar o olho. Um motor de passo é introduzido para controlar o posicionamento da lente de focagem permitindo um controlo mais preciso da localização do plano focal e a diminuição dos artefactos devidos ao movimento desta lente. Por outro lado, a densidade de queratócitos é

2. MICROSCOPIA CONFOCAL DA CÓRNEA *IN VIVO*

calculada de forma automática, com base num algoritmo de segmentação e contagem dos queratócitos nas diferentes imagens do volume adquirido, e reportada como densidade volumétrica. Para tal os autores utilizaram a espessura total da córnea e determinaram a densidade volumétrica para todo o estroma. Não são apresentados valores para as diferentes regiões do estroma.

Mustonen (Mustonen, 1998a) foi o primeiro a publicar medidas *in vivo* de densidade celular para as várias camadas da córnea: superficial epitelial, basal epitelial, estroma anterior, estroma posterior e endotelial. As medidas foram feitas em córneas saudáveis. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as densidades do estroma anterior e posterior (maior densidade no estroma anterior) e confirmada a correlação negativa entre a densidade de células endoteliais e a idade. As densidades de queratócitos no estroma são reportadas como densidades superficiais tendo os autores o cuidado de as designar por densidades aparentes. No mesmo número da revista, os autores publicaram as primeiras observações quantitativas da distrofia de Fuchs (Mustonen, 1998b) indicando as dimensões das bandas negras e das “*guttatas*” observadas e densidade das células endoteliais. Um aspecto importante é a primeira comparação entre os valores de densidade de células endoteliais obtidos por microscopia confocal e por microscopia especular. Segundo os autores, os valores são concordantes.

Outro momento importante foi a publicação da primeira avaliação quantitativa do processo de cicatrização após cirurgia refractiva por PRK através da observação da microestrutura da córnea. O trabalho foi realizado em coelhos mas toda a metodologia podia ser aplicada sem qualquer alteração a humanos. Moller-Pedersen e colaboradores (Moller-Pedersen, 1998b) utilizaram um microscópio *tandem scanning* com varrimento axial do plano focal para medir a espessura do epitélio e do estroma. Mediram ainda a reflectividade da córnea para obter uma quantificação do *haze* da córnea. A realização de medições em vários instantes durante um período de 6 meses após a cirurgia permitiu obter uma caracterização quantitativa do processo de cicatrização.

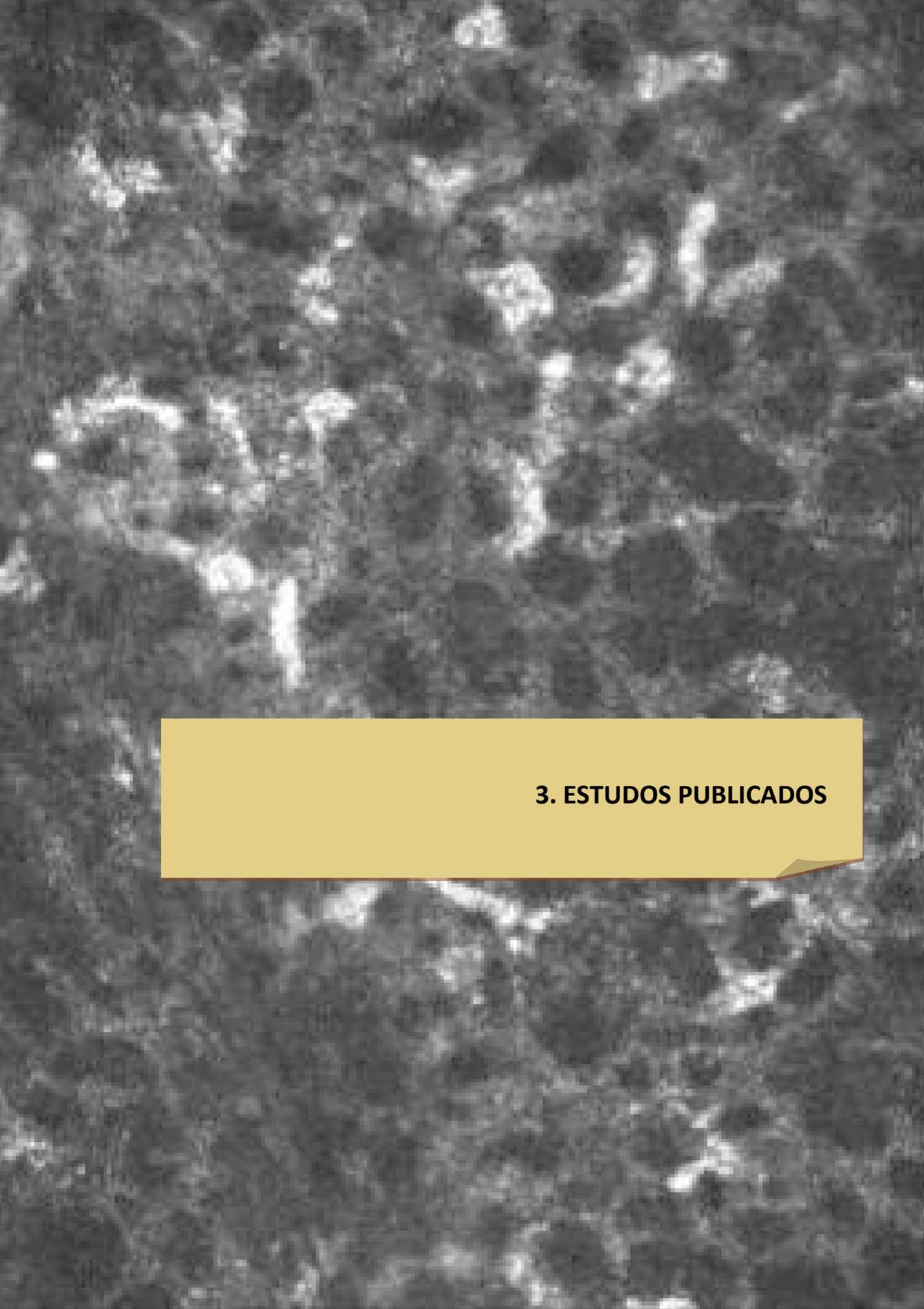
AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Em 1999 surge a primeira utilização das técnicas de estereologia para a determinação correcta de densidades volumétricas de queratócitos, bem como a validação destas medidas por técnicas de histologia (Patel, 1999). O trabalho foi realizado em córneas de coelhos e baseou-se num microscópio confocal *tandem scanning*. As imagens do estroma foram processadas automaticamente por um algoritmo que incluía correcção da não-homogeneidade de iluminação, seguida de filtragem de ruído, equalização adaptativa de histograma para aumentar o contraste das imagens, segmentação dos queratócitos por binarização da imagem e operações morfológicas para eliminar objectos de pequenas dimensões, preencher zonas no interior de objectos e eliminar pontes entre objectos de dimensões compatíveis com as dos queratócitos. A contagem dos objectos foi realizada utilizando uma moldura de contagem não enviesada, de acordo com os princípios da estereologia (Gundersen, 1988; Gundersen, 1977). A densidade volumétrica de queratócitos foi obtida usando métodos estereológicos a partir do valor da secção óptica axial de cada imagem. Os valores obtidos *in vivo* por microscopia confocal da córnea foram comparados com as densidades volumétricas de queratócitos obtidas por histologia, sendo os limites de concordância entre as duas técnicas calculados pelo método de Bland e Altman (Bland, 1986). Com este trabalho ficou provado que é possível medir *in vivo*, de forma reprodutível e válida, a densidade volumétrica de queratócitos. Como as medições foram feitas em coelhos anestesiados ficava por demonstrar se estas medidas seriam realizáveis em humanos conscientes. Os autores demonstraram isso mesmo em dois trabalhos subsequentes: um em que foram avaliadas as densidades de queratócitos em córneas após PRK (Erie, 1999) e outro em que foram medidas *in vivo*, pela primeira vez, densidades volumétricas em diferentes secções do estroma de córneas humanas saudáveis (Patel, 2001).

A utilização de métodos quantitativos para avaliação *in vivo* da córnea por microscopia confocal desenvolveu-se a partir do início do século XXI. Foi avaliada a fiabilidade e reprodutibilidade intra- e inter-observador da avaliação das células endoteliais (Imre, 2001), a densidade dos queratócitos no estroma posterior após LASIK (Pisella, 2001), a variação com a idade das populações de células endoteliais e de queratócitos, em córneas saudáveis (Hollingsworth, 2001), a densidade volumétrica

de queratócitos nas metades anterior e posterior do lentículo no LASIK (Mitooka, 2002), após PRK (Erie, 2003) e no queratocone (Erie, 2002), a densidade e área das células basais epiteliais em córneas saudáveis, com distrofia de Fuchs e com queratopatia bolhosa (Harrison, 2003).

As primeiras medições de densidades volumétricas de queratócitos, usando um microscópio confocal de varrimento de fenda, datam de 2002 (Berlau, 2002). Neste trabalho não é claro se as técnicas estereológicas foram empregues na determinação das densidades volumétricas, nem é indicado como foi determinado o valor da secção axial óptica correspondente a cada imagem, sendo plausível que o valor utilizado de 10 μm corresponda ao que consta da literatura comercial do fabricante do microscópio confocal.

The background is a dark, grainy, and textured surface, possibly a scan of a document or a photograph of a rough material. A bright yellow rectangular sticky note is placed in the lower-middle section of the page, with a small corner folded over. The text on the note is in a bold, black, sans-serif font.

3. ESTUDOS PUBLICADOS

Corneal Cell Density Measurement in vivo by Scanning Slit Confocal Microscopy: Method and Validation

Mónika Popper^{a,d} António Miguel Morgado^{b,c} Maria João Quadrado^a
Jaap A. Van Best^a

Departments of ^aOphthalmology and ^bInstrumentation, Institute of Biomedical Research on Light and Image, and ^cDepartment of Physics, Coimbra University, Coimbra, Portugal; ^d1st Department of Ophthalmology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Key Words

Corneal layers · Cell density · Scanning slit confocal microscope · Density validation

Abstract

Purpose: Method and validation of a technique to quantify cell density in vivo in 6 corneal layers with a scanning slit confocal microscope (SSCM). **Method:** A confocal image of a small volume in a corneal layer is registered on videotape. Cells or nuclei according to a layer classification are counted manually using an unbiased frame. Surface cell density is calculated from an image on the screen, and volumetric density is obtained using stereological methods. **Results:** Image distortion on the screen is less than 3%. The classification of a cell layer is verified by determining the position of the measurement volume in the cornea. Validation of density measurements is performed by comparing confocal results with those ob-

tained by histology. The difference between the two methods varies from -24.1% (posterior stroma) to +16.4% (basal layer). Intersession and intrasession repeatability are 8.3 and 5.8%, respectively. The cell density (mean \pm SD) in 20 healthy controls in the superficial, basal and endothelial layers was 759 ± 162 , $5,817 \pm 632$ and $2,743 \pm 285$ cells \cdot mm⁻² (surface), and in the anterior, mid and posterior stroma $28,616 \pm 3,081$, $19,578 \pm 4,421$ and $26,073 \pm 5,962$ cells \cdot mm⁻³ (volumetric). These results are in accordance with those of other investigators. **Conclusions:** The SSCM can produce repeatable quantitative measurements of corneal cell density in conscious humans.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

Introduction

Corneal confocal microscopy (CoCM) produces high-resolution in vivo images of thin corneal layers enabling the identification of structures without depending on conventional histology techniques [1–4].

Cell size and density measurements in several corneal layers have already been used in vivo to compare normal

Part of this work was presented as a poster (#150) at the Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) in Fort Lauderdale, Fla., USA, April 2004.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2004 S. Karger AG, Basel
0030-3747/04/0365-0270\$21.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/ore

Mónika Popper, MD
IBILI-Institute of Biomedical Research on Light and Image
Azinhaga de Santa Comba-Celas
PT-3000-354 Coimbra (Portugal)
Tel. +351 239 480201, Fax +351 239 480217, E-Mail popperm@bigfoot.com

and pathological conditions [1, 5–12]. The methods applied range from manual techniques based on cell marking or cell border tracing [8, 13, 14] to fully automated cell identification and counting [15–17]. The acceptance of CoCM as a method for cell size and density measurements implies validation of the results against equivalent results obtained by histological techniques and knowledge about the reliability and repeatability of the confocal measurements.

We present a manual technique to measure cell density with a commercial scanning slit confocal microscope (SSCM). The paper describes the classification of corneal layers, the image acquisition, the counting method, the determination of surface and volumetric cell densities, the repeatability of the measurements, the validation of all densities by histology and a comparison of results on healthy controls with those of other investigators.

Method

Instrumentation

The confocal microscope used for *in vivo* examination of human corneas was a SSCM (Confoscan P4, Tomey, Fortune Technologies, Vigonza, Italy) equipped with the standard Achromplan nonaplanating water immersion objective (Zeiss, Oberkochen, Germany, 40×/0.75 numeric aperture) [13, 18]. The instrument visualizes *in vivo*, on a computer screen, yellow light scattered by corneal structures in the measurement volume. After administration of a drop of topical anesthetic in the eye (0.4% oxybuprocaine chlorhydrate, Anestocil®, Oftalder, Oeiras, Portugal) and one drop of clear gel (sodium hyaluronate 10 mg/ml, Healon®, Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Sweden) as immersion fluid for optical coupling between the objective lens and cornea, the patient was seated in front of the microscope with the aid of a chin rest and a flashing fixation lamp for the contralateral eye to minimize eye movement. During image acquisition, optical sections were displayed in real time (25 frames·s⁻¹) on a computer screen and were recorded on S-VHS videotape [18–20]. The total examination time was about 2 min.

Classification of the Different Corneal Layers

Six corneal layers were considered for cell density measurements: superficial, basal epithelial, anterior, mid, posterior stroma and endothelium. Classification of these layers was made by an ophthalmologist experienced in the cornea, and was based on the morphological features stated below.

Superficial Epithelial Layer

The first layer (fig. 1A) encountered in the cornea is that of the superficial epithelial cells. The nucleus of these cobblestone-like cells is recognized by CoCM as a bright, round spot in the middle of a multicornered dark cell. These cells are randomly spread and have a length of 40–50 μm and a thickness of about 4 μm [4, 21, 22]. The estimated diameter of the nucleus is 4 μm, and the layer thickness is 10 μm. These cells should not be confused with the adjacent deeper-lying wing cells [22, 23] which have a more regular shape, are regular-

ly spread and adjoined and are situated just in front of the basal cell layer.

Basal Epithelial Layer

Basal epithelial cells (fig. 1B) can be recognized by CoCM as a monolayer of small adjoined dark cells in a honeycomb-like structure surrounded by a less dark membrane situated just above Bowman's membrane. The basal epithelial cells have a thickness of about 20 μm and a diameter of about 10 μm [4, 21, 22].

Anterior Stroma

We considered the first layer below Bowman's membrane as the anterior stroma (fig. 1C). Only the nuclei of keratocytes could be seen. They can be recognized as well-defined multi-angulated bright objects against a dark background [14, 24]. The maximal total length of such a nucleus is 50 μm, and it is approximately 1–2 μm thick [23, 25]. The layer thickness was estimated to be around 150 μm [24]. The layer contains large nerve bundles [4, 21, 26–28]. Nuclei from keratocytes can be differentiated from those of Schwann cells by the typical position of the latter cells around nerves.

Mid Stroma

The mid stroma (fig. 1D) stretches from the anterior up to the posterior stromal layer. It contains keratocytes and, usually, large nerve bundles [18, 27]. The nuclei of these keratocytes have a regular oval shape with a randomly pointed axis and are homogeneously distributed. The size of these nuclei is similar to that of the keratocytes in the anterior stroma.

Posterior Stroma

The posterior stroma (fig. 1E) is situated in front of Descemet's membrane and has an estimated thickness of 100 μm [24]. The nuclei of the keratocytes in this layer are much more elongated than those in the mid stroma [4]. Probably this layer does not contain nerves [18].

Endothelium

The endothelium (fig. 1F) is a monocellular layer of adjoined hexagonal cells with a regular pattern and a honeycomb-like appearance [4]. The cell membrane is dark, and the body is lighter. The average cell diameter is 18–20 μm, and the thickness is 5–6 μm [4].

Counting Method

Counts were performed manually using the best focused images (with no motion blur) recorded on videotape. This was achieved by marking each clearly defined cell or nucleus in a predefined rectangular frame on the computer screen. An unbiased counting frame [29, 30] was used: all cells even partially inside the frame were marked provided they did not intersect the two exclusion edges of the frame.

The precise area of the counting frame and the surface cell density (number of cells per square millimeter) were calculated by the Confoscan P4 software. The precision of this procedure was verified as stated below (see Validation, Image Size and Distortion).

For the superficial, basal and endothelial cells, surface density was used since these cells are assumed to form monolayers. The surface density of stromal keratocyte nuclei (N_A = number of nuclei per square millimeter) was first determined with the Confoscan software using the counting frame and the marked cells. The volumetric density required for stromal keratocytes was calculated using stereological principles. This density (N_V = number of cells per cubic millimeter) was obtained by dividing the measured surface density by the sum of

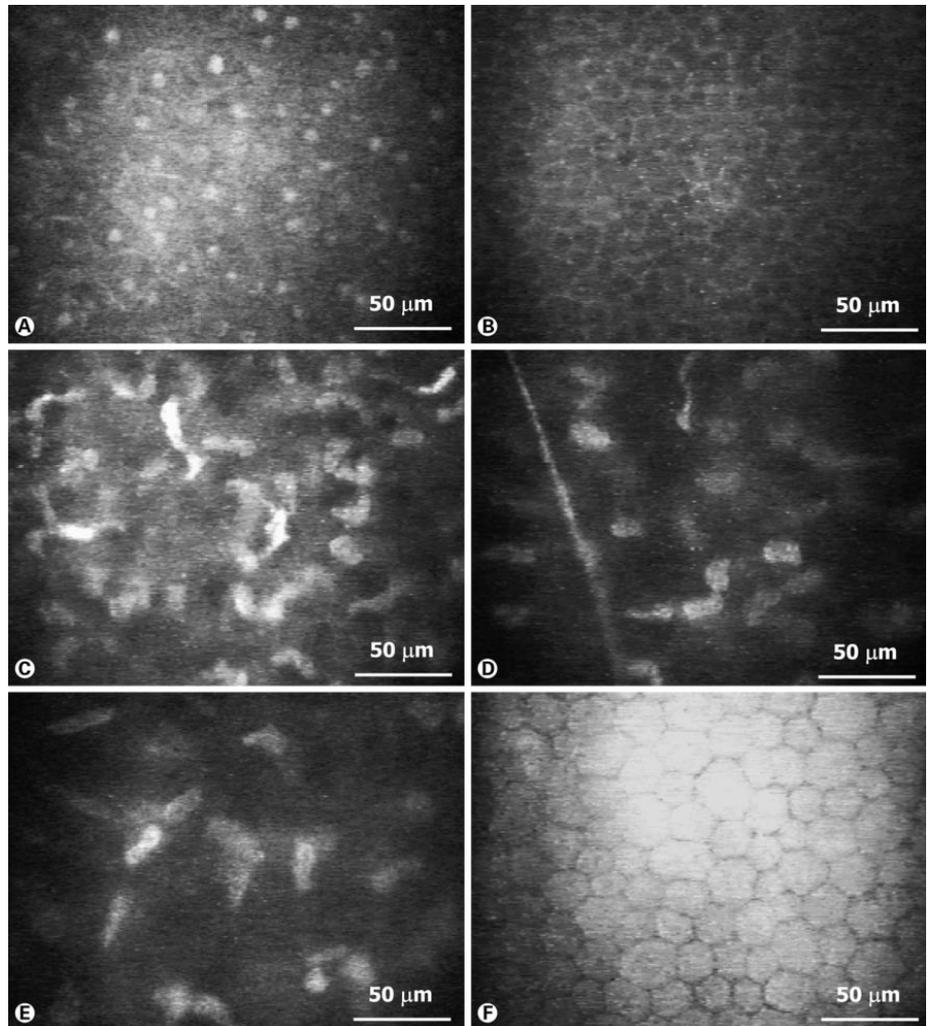


Fig. 1. Typical in vivo confocal microscopy images in healthy humans. Area: $293 \times 213 \mu\text{m}$. **A** Superficial epithelial layer. **B** Basal epithelial layer. **C** Anterior stroma. **D** Mid stroma. **E** Posterior stroma. **F** Endothelium.

the optical section thickness (t) and the mean size of the keratocytes along the direction normal to the counting plane (D):

$$N_v = N_A / (t + D)$$

This expression is obtained from Abercrombie's correction factor [31]. The thickness t is given by the full width at half maximum (FWHM) of the confocal microscope point spread function (PSF, $8 \mu\text{m}$; see Results of Validation). We used for D a value of $1 \mu\text{m}$,

which was obtained from measurements performed on light micrographs of cross-sections throughout the cornea. This value is in accordance with keratocyte width reported in the literature [23, 25].

In this study, counts were performed independently and in a masked fashion by 2 observers. After a short pilot study, the method for recognizing and counting cells was approved by mutual agreement of both observers.

Validation

Point Spread Function

The optical sectioning property of the microscope depends on its axial resolution. The axial resolution is evaluated by the FWHM of the PSF. We measured the PSF using the technique of moving a perfect reflector axially through focus [32]. The experimental setup comprised a Melles-Griot model 01 MFG 011 (Irvine, Calif., USA) plane mirror mounted on a precision positioner (Melles-Griot Micro-Block™ 17 AMB 003). The microscope was fixed, focused on a given plane, and the mirror was scanned through that plane at 1-µm steps. For each step, an image was recorded. The intensity values obtained from each image were used to calculate the PSF.

Image Size and Distortion

On-screen image distortion was evaluated using a USAF 1951 chromium test target (Melles-Griot model 04TRP003) positioned at various places in front of the microscope. The dimensions of a calibrated square on the target (55.2 × 55.2 µm) were measured using the Confoscan P4 software. The counting area reported by the Confoscan P4 software was also validated with the test plate.

Validation of the Image Classification

The criteria used to classify images, based on the layer definitions given above, were validated by measuring the position of the measurement volume along the optical axis. The relative position of such an optical section was visualized on a digital voltmeter connected to a precision potentiometer coupled to the calibrated microscope position wheel. This method requires an immobile eye between the measurement of a reference layer and that of the optical section. We used a whole donor eye (2 h post mortem) and 1 eye of a healthy volunteer. CoCM was performed as usual, and the positions of the selected images were compared to those of the layer classification. Thickness values for wing cell layer (20 µm) [22, 23], Bowman’s membrane (10 µm) [21, 22] and Descemet’s membrane (10 µm) [21] were obtained from the literature.

Repeatability of the Measurements

The intrasession repeatability was assessed by repeating measurements on a cornea, using different images selected from the same recording session. The intersession repeatability was assessed by repeating measurements on the same cornea after 14 days. The measurements were done by the 2 observers on 3 healthy volunteers. The intra- and intersession repeatability coefficients were calculated according to the definition issued by the British Standards Institution [33]. The coefficients were calculated by multiplying the standard deviation of the differences between measurements by a factor of 1.96. They represent the maximum predicted difference between experiments, with a 95% level of confidence.

Validation of Cell Densities

Validation of the use of CoCM for density measurements was performed, in each corneal layer, by comparing the results obtained on 3 human donor corneas by CoCM in optical sections perpendicular to the optical axis of the cornea with those obtained by a conventional microscope (Nikon Eclipse TE 300, Tokyo, Japan) on the same cornea in sections cut perpendicularly to the optical axis. Biomicroscopic observations of the donor corneas did not show any morphological changes.

After collection of the eye (2 h post mortem), all corneal layers were examined with CoCM. Immediately after the examination, the

Table 1. Image distortion

Position on screen	Width µm	Height µm	Area mm ²
Center	57	52	0.00297
Bottom left	56	54	0.00302
Bottom right	58	52	0.00302
Top left	58	54	0.00313
Top right	58	54	0.00313
Average ± SD	57.4 ± 0.9	53.0 ± 1.4	0.00304 ± 0.000094

Position on screen: position of the measured 55.2 × 55.2 µm = 0.00305 mm² calibration pattern on the computer screen; the largest usable image on screen was 293 × 213 µm calculated using the Confoscan P4 software. Width, height, area: measured dimensions. SD = Standard deviation.

cornea was excised, cut with an 8-mm diameter calibrated corneal trephine and fixated with 10% buffered formalin. After fixation, the cornea button diameters were measured with calipers. Shrinkage was measured by comparing the button diameters before and after fixation. The button was prepared for histology by embedding in paraffin and cutting 8-µm-thick frontal sections. The sections were stained with hematoxylin-eosin. Volumetric cell densities were calculated from the corresponding surface densities using the same stereological technique applied in CoCM, with correction for tissue shrinkage, which was assumed equal for all corneal layers. Results were analyzed according to the statistical method proposed by Bland and Altman [34].

Measurements in Healthy Controls

Twenty healthy controls with ages between 28 and 74 years (average: 53.7) without previous ophthalmic or systemic disease were recruited. All healthy controls underwent a prior slitlamp biomicroscopy examination. The cell density in the 6 corneal layers was measured, and results were compared with those of other investigators. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Medical Ethics Committee of the Coimbra University Hospital. Informed consent was obtained from all participants after explanation of the nature and possible consequences of the study.

Results of Validation

The measured PSF has a FWHM value of 8 µm. The results concerning image distortion are presented in table 1. The maximal deviation was less than 3%. Table 2 presents the image classification validation results. All layers, as defined by the classification, were selected within the expected location, except the *in vivo* measured basal layer which was 3% below the range limit. The total

Table 2. Depth of corneal layers

Cell layer ^a	Theoretical dimensions ^b			Distance measured from endothelium							
	thickness		range in cornea %	in vitro (donor eye)					in vivo (healthy control)		
	µm	%		observer 1 ^c		observer 2 ^c		ultrasonic pachymetry µm	observer 1 ^c		ultrasonic pachymetry µm
			µm	%	µm	%	µm		%		
Superficial	10	2	98–100	629	100	640	100	675.0 ± 5.1	580	100	555.0 ± 3.4
(Wing cells)	20	4	94–98	–	–	–	–	–	–	–	–
Basal	20	4	90–94	572	91	581	91	–	502	87	–
(Bowman's layer)	10	2	88–90	–	–	–	–	–	–	–	–
Anterior stromal	150	30	58–88	559	89	556	87	–	440	76	–
Mid stromal	174	34.8	23.2–58	267	42	298	47	–	188	32	–
Posterior stromal	100	20	3.2–23.2	53.6	8.6	59.5	9.3	–	37.2	6.4	–
(Descemet's membrane)	10	2	1.2–3.2	–	–	–	–	–	–	–	–
Endothelial	6	1.2	0–1.2	0	0	0	0	–	0	0	–
Sum	500	100									

^a Cell layer according to classification; in parentheses: data obtained from literature only.
^b Theoretical dimensions according to specifications and assuming normal cornea with a thickness of 500 µm.
^c Distance measured with a calibrated potentiometer coupled to the turn wheel of the confocal microscope.

Table 3. Validation of confocal density determination (3 donor corneas)

Cell layer ^a	Surface density, cells · mm ⁻²		Difference %	Volumetric density, ^b cells · mm ⁻³		Difference %
	confocal mean ± SD	histology ^c mean ± SD		confocal mean ± SD	histology ^c mean ± SD	
Superficial	1,014 ± 129 (12.7)	1,037 ± 222 (21.4)	-2.2	–	–	–
Basal	5,945 ± 622 (10.5)	5,046 ± 896 (17.8)	+16.4	–	–	–
Anterior stromal	320.9 ± 81.6 (25.4)	316.0 ± 77.8 (24.6)	+1.5	35,740 ± 8,075 (22.6)	33,484 ± 9,099 (27.2)	+6.5
Mid stromal	193.2 ± 48.7 (25.2)	212.5 ± 15.0 (7.1)	-9.5	21,205 ± 4,982 (23.5)	24,284 ± 3,617 (14.9)	-13.5
Posterior stromal	233.1 ± 55.5 (23.8)	296.9 ± 74.1 (24.9)	-24.1	26,401 ± 6,911 (26.2)	32,708 ± 9,054 (27.7)	-21.3
Endothelial	2,455 ± 285 (11.6)	2,224 ± 563 (25.3)	+9.9	–	–	–

^a Cell layer according to classification.
^b Volumetric density calculated from surface density using stereological methods.
^c Histology of the same sample corrected for a shrinkage of 6.0%. Figures in parentheses indicate percentages.

Table 4. Corneal cell density by different investigators

Cell layer	Type	Mean density					
		our study (n = 20, 24–74 years)	Patel et al. [14] (n = 69, 12–80 years)	Hahnel et al. [24] (n = 3 in vitro)	Berlau et al. [36] (n = 49, 22–69 years)	Mustonen et al. [13] (n = 58, 20–84 years)	Grupcheva et al. [39] (n = 30, age 70 ± 5 years)
Superficial	s	759 (21.4)	–	–	–	1,213 (30.5)	–
Basal	s	5,817 (10.9)	–	–	–	5,699 (10.6)	–
Anterior stromal	v	28,616 (20.7)	28,838 (30.9)	26,100	24,320 (27.7)	–	27,417 (16.9)
Mid stromal	v	19,578 (22.6)	19,241 (15.0)	18,500	11,610 (37.0)	–	–
Posterior stromal	v	26,073 (11.8)	19,947 (16.3)	14,100	18,850 (24.5)	–	32,325 (15.2)
Endothelial	s	2,743 (10.4)	–	–	–	3,055 (12.6)	–

s = Cell surface density (cells · mm⁻²); v = cell volumetric density (cells · mm⁻³); n = number of eyes; – = not specified. Figures in parentheses indicate percent SD.

thickness of the cornea was confirmed in both cases by ultrasonic pachymetry (Pachette®, DGH Technology Inc., Exton, Pa., USA).

The average (all corneal layers, both observers) intrasession repeatability coefficient was 5.8% (range: 0.4–10.2%), and the average intersession repeatability coefficient was 8.3% (1.9–16.9%). In both cases, the best repeatability was observed on the endothelium.

Table 3 shows the validation of cell densities measured with the confocal microscope by histology. The results were obtained with 3 donor corneas. The difference between both methods was on an average -1.3% and ranged between -24.1% (posterior stroma) and +16.4% (basal layer). The mean difference between stromal cell densities by the two methods was -2,377 cells·mm⁻³. The 95% confidence limits of agreement were -10,742 and 5,989 cells·mm⁻³. Mean differences for the superficial, basal and endothelial cell densities were -22.1, 899.1 and 231.1 cells·mm⁻², respectively. The measured mean tissue shrinkage was 6.0%.

For the measurement of cell densities in healthy human corneas, 5 different images were evaluated from each corneal cell layer. Our results are summarized in table 4 and compared to those of other investigators. Superficial cell density was 759 ± 162 cells·mm⁻² (mean ± SD; n = 20). For the basal layer, the cell density was 5,817 ± 632 cells·mm⁻². The volumetric cell density in the mid stroma (19,578 ± 4,421 cells·mm⁻³) is significantly lower than in the anterior (28,616 ± 3,081 cells·mm⁻³) or posterior stroma (26,073 ± 5,962 cells·mm⁻³). In the endothelium, the cell density was 2,743 ± 285 cells·mm⁻².

Discussion

Repeatable quantitative measurements of corneal cell density in conscious humans based on the cell layer classification presented and using the manual counting technique can be performed with the SSCM Tomey Confoscan P4. This is shown by the measured mean intra- and intersession repeatabilities for all corneal layers and both observers. The higher repeatability found for the endothelium is a consequence of its morphological features, such as regular pattern and high reflectivity, which greatly improve visual detection and counting.

The measured FWHM of the PSF (8 µm) is in agreement with the 10-µm value specified for the optical section axial thickness of the Confoscan P4 [3, 4, 13] and is probably better than the 15-µm value reported as typical for Tomey SSCMs [35].

The image size error and distortion were within well-acceptable limits (3%). The measurement of the depth of corneal layers (table 2) indicates that a reproducible separation of these layers can be obtained with the cell classification presented.

Agreement between cell density measurement by CoCM and histology was acceptable for all 6 corneal layers examined (table 3) since all density differences between the two measurement techniques were within the corresponding limits of agreement. The largest difference between CoCM and histology was found in the posterior stromal layer. The same situation was reported by Patel et al. [17]. These authors suggested that this larger difference could result from less light reaching the posterior stroma or from a nonuniformity of tissue shrinkage. Differences between CoCM and histology can also result from tilting during embedding in paraffin, which produces oblique sections.

The average surface density of superficial and basal cells for healthy controls corresponds with that of Mustonen et al. [13] (table 4). The average volumetric cell density in all stromal layers of healthy controls (2.5·10⁴ cells·mm⁻³) is about in accordance with that found in previous CoCM investigations: about 2·10⁴ cells·mm⁻³, [14, 24, 36], 1.6·10⁴ cells·mm⁻³ [16], 4.1·10⁴ cells·mm⁻³ [37] (table 4). Some investigators [8] using a similar instrument (Confoscan 2.0) to ours found higher values of surface density in the anterior and posterior stroma (650 and 514 instead of 258 and 235 cells·mm⁻² measured in this study, respectively). These higher values may be attributed to a less strict cell counting algorithm. In our study, the average standard deviation of the density in the 3 stromal layers was 28.6%, corresponding to that found previously for healthy controls (28.8% [36], 14–31% [14]). The decrease in cell density in the mid stroma found in our study, in comparison with the anterior (31.6%) and posterior stroma (24.9%), confirms previous observations in rabbits (a 30% decrease in cell density over the anteroposterior stromal thickness and a slight increase in the region adjacent to Descemet’s membrane [38]) and in healthy humans (the lowest cellular density was found in the central stroma [36]). The cell density in the anterior stroma was higher than in the posterior stroma, but the difference was not significant, in contrast with some previous observations (+46% [24], +31% [14], +22% [36], -15% [39], +21% [8]).

This study has shown that it is possible to obtain valid measurements of corneal cell density using an SSCM.

Acknowledgements

The authors thank Mrs. Cristina Ramos and Lajos R. Kozák, MD, MSc, from the IBILI Centre of Ophthalmology and Vision Sciences at the Coimbra University, and Viktória Szabó, MD, from

Semmelweis University, Budapest, Hungary for their help concerning the English text and technical assistance as well as Júlia Verissimo, MD, and Isabel Garrido for the histological preparations.

References

- Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, McCulley JP, Jester JV: Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 1993;100:1444–1454.
- Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney DF, Coroneo M: In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol* 2003;87:225–236.
- Masters BR, Bohnke M: Three-dimensional confocal microscopy of the living human eye. *Annu Rev Biomed Eng* 2002;4:69–91.
- Bohnke M, Masters BR: Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:553–628.
- Morishige N, Chikama TI, Sassa Y, Nishida T: Abnormal light scattering detected by confocal biomicroscopy at the corneal epithelial basement membrane of subjects with type II diabetes. *Diabetologia* 2001;44:340–345.
- Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE, Daley TE: Diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea* 1995;14:10–17.
- Pfister DR, Cameron JD, Krachmer JH, Holland EJ: Confocal microscopy findings of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 1996;121:119–128.
- Ciancaglini M, Carpineto P, Zuppardi E, Nubile M, Doronzo E, Mastropasqua L: In vivo confocal microscopy of patients with amiodarone-induced keratopathy. *Cornea* 2001;20:368–373.
- Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK: In vivo confocal microscopy of Fuchs' endothelial dystrophy. *Cornea* 1998;17:493–503.
- Chiou AG, Kaufman SC, Beuerman RW, Ohta T, Soliman H, Kaufman HE: Confocal microscopy in cornea guttata and Fuchs' endothelial dystrophy. *Br J Ophthalmol* 1999;83:185–189.
- Holopainen JM, Moilanen JA, Tervo TM: In vivo confocal microscopy of Fleck dystrophy and pre-Descemet's membrane corneal dystrophy. *Cornea* 2003;22:160–163.
- Fruch BE, Bohnke M: In vivo confocal microscopy of Fleck dystrophy. *Cornea* 1999;18:658–660.
- Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK: Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea* 1998;17:485–492.
- Patel S, McLaren J, Hodge D, Bourne W: Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:333–339.
- Prydal JI, Franc F, Dilly PN, Kerr Muir MG, Corbett MC, Marshall J: Keratocyte density and size in conscious humans by digital image analysis of confocal images. *Eye* 1998;12:337–342.
- Stave J, Slowik C, Somodi S, Hahnel C, Grummer G, Guthoff R: Keratinocyte density of the cornea in vivo: Automated measurement with a modified confocal microscopy MICROPTHAL. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1998;213:38–44.
- Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, Nelson LR, Bourne WM: Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:320–326.
- Oliveira-Soto L, Efron N: Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea* 2001;20:374–384.
- Masters BR, Thera AA: Real-time scanning slit confocal microscopy of the in-vivo human cornea. *Appl Opt* 1994;33:695–701.
- Wiegand W, Thera AA, Kroll P, Geyer OC, Garcia AJ: Optical sectioning of the cornea with a new confocal in vivo slit-scanning videomicroscope. *Ophthalmology* 1995;102:568–575.
- Rodrigues MM, Waring GO, Hackett J, Donohoo P: Cornea; in Jakobiec FA (ed): *Ocular Anatomy, Embryology and Teratology*. Philadelphia, Harper & Row, 1982, pp 153–165.
- Masters BR, Thera AA: In vivo real-time confocal microscopy of wing cells in the human cornea: A new benchmark for in vivo corneal microscopy. *Bioimages* 1995;3:7–11.
- Smolek MK, Klyce SD: Cornea; in Tasman W, Jaeger EA (eds): *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*, rev ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1995.
- Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, Guthoff RF: The keratocyte network of human cornea: A three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea* 2000;19:185–193.
- Muller LJ, Pels L, Vrensen GF: Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:2557–2567.
- Auran JD, Koester CJ, Kleiman NJ, Rapaport R, Bomann JS, Wirotko BM, et al: Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea. *Ophthalmology* 1995;102:33–41.
- Schimmelpennig B: Nerve structures in human central corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1982;218:14–20.
- Muller LJ, Pels L, Vrensen GF: Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:476–488.
- Gundersen HJG: Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: The edge effect. *J Microsc* 1977;111:19–223.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379–394.
- Abercrombie M: Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 1946;94:239–247.
- Wilson T: Optical aspects of confocal microscopy; in Wilson T (ed): *Confocal Microscopy*. London, Academic Press, 1990, pp 93–141.
- British Standards Institution: Precision of Test Methods 1: Guide for the Determination and Reproducibility for a Standard Test Method (BS 597, Part 1). London, BSI, 1975.
- Bland JM, Altman DG: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;i:307–310.
- Cavanagh HD, El Agha MS, Petroll WM, Jester JV: Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: Diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea* 2000;19:712–722.
- Berlau J, Becker HH, Stave J, Oriwol C, Guthoff RF: Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas – A study using scanning-slit confocal microscopy in vivo. *J Cataract Refract Surg* 2002;28:611–616.
- Moller-Pedersen T, Ledet T, Ehlers N: The keratocyte density of human donor corneas. *Curr Eye Res* 1994;13:163–169.
- Petroll WM, Boettcher K, Barry P, Cavanagh HD, Jester JV: Quantitative assessment of anterior-posterior keratocyte density in the normal rabbit cornea. *Cornea* 1995;14:3–9.
- Grucpeva C, Craig J, Sherwin T, McGhee J, McGhee C: Stereological analysis of keratocyte density in the human cornea using in vivo confocal microscopy as an optical dissector (ARVO abstract 1524). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;41:S281.

Diabetes and Corneal Cell Densities in Humans by In Vivo Confocal Microscopy

Maria João Quadrado, MD,* Monika Popper, MD,*† António Miguel Morgado, PhD,‡§ Joaquim Neto Murta, MD, PhD,* and Jaap A. Van Best, PhD*

Purpose: Diabetes is accompanied by an increased autofluorescence of the cornea, probably because of accumulation of advanced glycation end products (AGEs). The pathogenic mechanism is still unknown. This study aimed to quantify differences in corneal cell densities between diabetic patients and healthy controls.

Methods: The left cornea of 15 patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) with level of retinopathy 20 according to the Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) and of 15 healthy controls were examined by noninvasive in vivo confocal microscopy in an observational prospective study. The cell densities in 6 corneal layers were determined along the optical axis of the cornea by using stereologic methods.

Results: The average cell density per unit area in the superficial and basal epithelium and the endothelial layer was 725 ± 171 , 5950 ± 653 , and 2690 ± 302 cells/mm² in controls and 815 ± 260 , 5060 ± 301 , and 2660 ± 364 cells/mm² in diabetic patients. The cell density per unit volume in the anterior, mid-, and posterior stroma was $26,300 \pm 4090$, $19,390 \pm 3120$, and $25,700 \pm 3260$ cells/mm³ in controls and $27,560 \pm 3880$, $21,930 \pm 2110$, and $25,790 \pm 3090$ cells/mm³ in patients with diabetes. In both groups, the density in the midstroma was significantly lower than in both the anterior stroma and the posterior stroma ($P < 0.02$). The cell density in the basal layer of diabetic patients was significantly lower than in healthy controls (-15.0% , $P < 0.0004$). In the other layers, no significant differences between both groups ($P > 0.07$) were observed.

Conclusions: The lower basal cell density found in patients with diabetes may result from a combination of different mechanisms including decreased innervation at the subbasal nerve plexus, basement

membrane alterations, and higher turnover rate in basal epithelial cells. The lower cell density in the midstroma of diabetic patients and healthy controls may be attributed in part to differences in oxygen concentration in the stromal layers (depths). Changes in cellular density did not seem to be responsible for the increased autofluorescence in diabetes.

Key Words: confocal microscopy, diabetes, corneal cell density

(*Cornea* 2006;25:761–768)

Studying the diabetic eye has particular relevance because diabetes is one of the major causes of vision loss and blindness in the western world.^{1,2} Diabetic retinopathy grading is of crucial interest in present-day health care. Corneal abnormalities related to diabetes, generally termed diabetic keratopathy, are present in more than 70% of diabetic patients³ and have been extensively reviewed.^{4,5} They include clinically observed alterations such as increased epithelial fragility⁶ and recurrent erosions,^{3,4} reduced sensitivity,^{7,8} increased autofluorescence,^{9,10} impaired wound healing,^{3,4,11} altered epithelial¹² and endothelial¹³ barrier function, and increased susceptibility to ulcers and edema. Experimental studies have detected alterations at the cellular level as epithelial basement membrane changes,^{14–18} altered collagen,¹⁹ higher polymegathism, and pleomorphism of both epithelial and endothelial cells,^{20–23} lower density,^{24,25} and higher tortuosity²⁶ of subbasal nerves.

The average autofluorescence of the cornea in diabetic patients is larger than that in healthy controls,^{9,10} probably as a result of the accumulation of advanced glycation end products (AGEs),²⁷ and increases with the severity of diabetic retinopathy.^{9,10,27–29} It can be noninvasively measured in a few seconds and was found to be predictive of the need for retinal laser treatment within 1 year after measurement.³⁰

To get insight into the possible pathology of the diabetic cornea, cell densities of different corneal layers were compared with those of healthy controls. In this study, the analysis was restricted to the superficial layer of the epithelium reflecting the physiological shedding of the outermost cells, the basal epithelial layer reflecting the continuous renewal of the epithelium, and the endothelial layer responsible for maintaining stromal transparency by regulating corneal hydration.³¹ Moreover, we analyzed the anterior stroma directly beneath the Bowman membrane, the posterior stroma directly bordering the Descemet membrane, and the endothelium and the midstroma halfway between the posterior and anterior side.

Received for publication March 10, 2005; revision received November 9, 2005; accepted February 5, 2006.

From the *Institute of Biomedical Research on Light and Image, Department of Ophthalmology, Coimbra University, Coimbra, Portugal; the †1st Department of Ophthalmology, Semmelweis University, Budapest, Hungary; the ‡Department of Physics, Coimbra University, Coimbra, Portugal; and the §Institute of Biomedical Research on Light and Image, Instrumentation Unit, Coimbra University, Coimbra, Portugal.

Supported by scholarships of INFARMED and Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/13710/2003), Lisbon, Portugal, and a travel grant from Pro Cultura Foundation, Budapest, Hungary (M.P.).

Presented at the Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, April 25–29, 2004, Fort Lauderdale, FL.

Reprints: Maria João Capelo Quadrado, MD, Institute of Biomedical Research on Light and Image, Azinhaga de Santa Comba-Celas, 3000-354 Coimbra, Portugal (e-mail: mjquadrado@netcabo.pt).

Copyright © 2006 by Lippincott Williams & Wilkins

The advantage of this strict sampling protocol is that the layers are well demarcated and that sampling errors among corneas will be minimal.³²

Although there are many quantitative studies on specular microscopy in diabetic and normal eyes,^{21–23,29,33,34} they deal almost exclusively with the endothelial layer. Measurements of endothelial cell density by contact specular, noncontact specular, and confocal microscopy produce equivalent results.^{35–37} Specular observation of the endothelium is possible only with a transparent cornea and a flat, smooth endothelial surface, conditions often compromised in diseased corneas. Specular observation of the epithelium is difficult and requires the use of an overlying contact lens that can cause compression artifacts.³⁸ Furthermore, specular microscopy is restricted by the absence of optical sectioning.

Confocal microscopy allows imaging of cellular structures by light reflection in a specified small volume of tissue while excluding light reflected elsewhere. It can be performed in real time and *in vivo*, providing noninvasive observation of layers and cells of the human cornea.³⁹ Different studies showed the reproducibility of corneal cell density measurements by confocal microscopy for the endothelial⁴⁰ and for all corneal layers,^{32,41} and these results were validated by histology for all corneal layers.^{32,41,42} Therefore, this technique has a great potential for clinical studies,^{39,43} is comparable to specular microscopy for endothelial cell count, and has superior quality for observation of other corneal layers and cells as well for imaging diseased corneas.

As far as we know, only Frueh et al²⁰ compared the density of corneal cells of diabetic patients with those of healthy controls by confocal microscopy. In our study, we measured, using a validated method,³² the cell densities in 6 corneal layers of diabetic patients in the early stages of diabetic retinopathy and healthy controls. Both studies are not restricted to the endothelial layer as by specular microscopy.^{21–23,29,33,34} Frueh et al²⁰ reported the density of basal cells, keratocytes, and endothelial cells. In this study, keratocyte densities are measured for different stromal depths, and the superficial epithelial and basal epithelial layers are analyzed separately.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Fifteen patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM; 9 men and 6 women) with level 20 of retinopathy (microaneurysms only; other characteristics absent), according to the Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (ETDRS),⁴⁴ between 39 and 69 years of age (mean age, 60.9 ± 8.5 years), were selected in an observational prospective study at their first visit to the Ophthalmology Clinic at the Coimbra University Hospital after referral by the physician. Diabetes duration ranged between 2 and 20 years (mean duration of diabetes, 11.3 ± 6.2 years). Patients wearing contact lenses and having an acute eye disease or previous ophthalmic history, except because of diabetes, were excluded. Fifteen healthy controls (4 men and 11 women), between 35 and 74 years of age (mean age, 59.3 ± 11.0 years),

not wearing contact lenses and without ophthalmic history, were selected for comparison.

Patients and controls were recruited in a consecutive way between July 2001 and July 2002. They underwent a slit-lamp examination, and epithelial abnormalities were checked by fluorescein staining.

The study was conducted according to guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Medical Ethics Committee of the Coimbra University Hospital. Informed consent was obtained from all participants after explanation of the nature and possible consequences of the study.

Methods

The study was performed using a scanning-slit confocal microscope (Confoscan P4, Tomey; Fortune Technologies, Vigonza, Italy) equipped with a standard Achroplan non-aplanating water immersion objective lens (×40/0.75 numeric aperture; Zeiss, Oberkochen, Germany). The yellow light scattered *in vivo* by the corneal structures in the measurement volume (optical section) was visualized on a computer screen. After administration of a drop of topical anesthetic (0.4% oxybuprocaine chlorohydrate, Anestocil; Oftalder, Oeiras, Portugal) in the left eye and 1 drop of clear gel (sodium hyaluronate 10 mg/mL, Healon; Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Sweden), as viscous immersion fluid for optical coupling of the front lens and the cornea, the patient was seated in front of the microscope with the aid of a chin rest and a flashing fixation lamp for the contralateral right eye to minimize eye movements. The optical section can be placed at any position on the cornea by changing the x-y and z-positions of the microscope. Image acquisition was performed by scanning the cornea along the optical axis (z-position) using the manual micrometer drive of the microscope. During image acquisition, optical sections were displayed in real time on the computer screen and recorded on S-VHS videotape (25 frames/s). *In vivo* examination of 1 eye takes about 2 minutes, resulting in the recording of approximately 3000 video frames per eye. The best-focused images (with no motion blur) recorded on videotape were selected for later analysis. The selection and analysis of the recorded data take about 1 hour per eye.

Cell layer classification, density determination, and validation are extensively described elsewhere.³² In this study, we deviated from our previous study and considered the first layer immediately beneath the Bowman membrane as anterior stroma, the layer in front of the Descemet membrane and endothelium as posterior stroma, and halfway as midstroma. After manually marking the cells or their nuclei in a predefined area (unbiased counting frame of Gundersen^{32,45}) on the computer screen, numerical density per unit area (N_A) was calculated using the microscope integrated software (Confo-Commander v2.7.1; Tomey). The numerical density per unit volume (N_V) at the indicated stromal sites of the cornea was calculated using an optical layer thickness of 9 μm.³² Validation of the method was obtained by histology, as previously described.³² Counting was performed stringently, independently, and in a masked fashion by 2 observers. To estimate the variation in cell density, 5 independent measurements in each

corneal layer were performed by each observer. For all layers except the midstroma, the independence of the samples was obtained by refocusing the objective lens in the layer, resulting in an arbitrary movement of about 50 μm perpendicular to the optical axis. For midstroma, the objective lens was furthermore moved from the middle of the stroma, parallel to the optical axis ($\sim 50 \mu\text{m}$). Total stroma cell density was calculated using a weighted mean of anterior, mid-, and posterior stroma cell densities, with the weights being the relative thickness of each layer.

All measurements were performed along the optical axis of the cornea.

Typical confocal microscopy images of a cornea of a diabetic patient with retinopathy level 20 are presented in Figure 1.

Statistical Procedures

The mean cell density in each corneal layer was separately calculated for each group and for each observer. The normality of the distribution of cell density in each corneal layer was assessed by the D'Agostino test for departure of normality, both for healthy controls and diabetic patients.⁴⁶

The differences between diabetic patients and healthy controls in each of the superficial epithelial, basal, endothelial, and total stromal layers were evaluated with the 2-tailed Student *t* test, when the distribution of values was normal, and with the Mann–Whitney *U* test when it was not normal. The theoretical basis of *t* testing assumes that the sample data came from a normally distributed population (parametric testing), assuring that the mean at hand came from a normal distribution

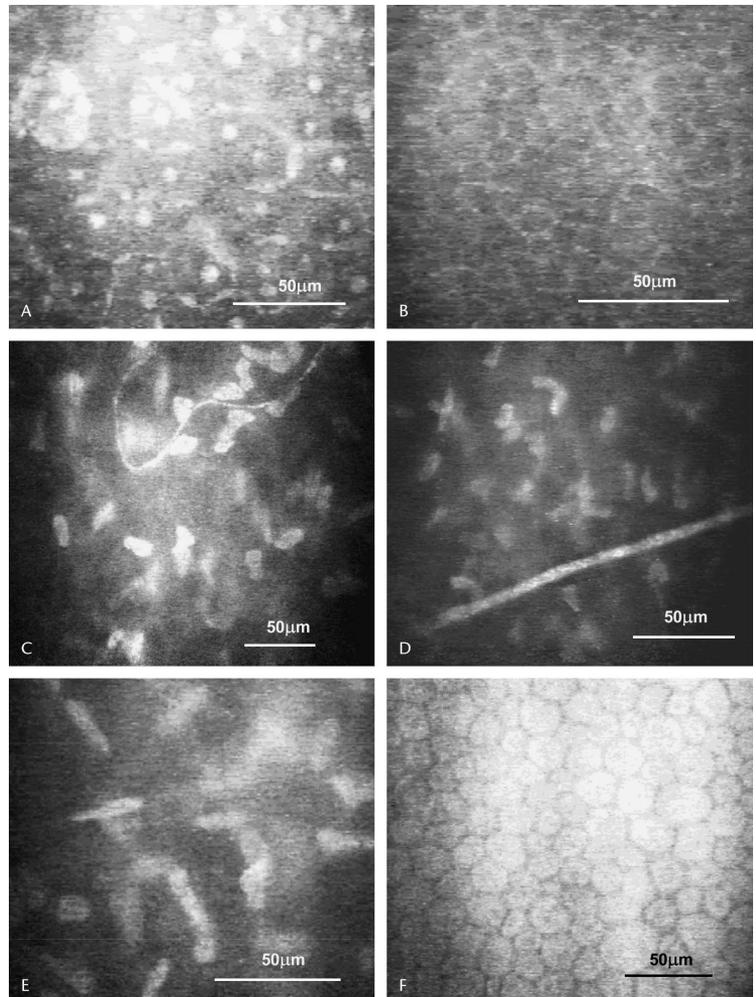


FIGURE 1. Typical in vivo confocal microscopy images of corneal layers of a 67-year-old male patient with NIDDM, diabetes duration of 20 years. A, Superficial epithelial layer. B, Basal epithelial layer. C, Anterior stromal layer. D, Midstromal layer. E, Posterior stromal layer. F, Endothelial layer.

of means. If the population is not normally distributed, a Student *t* test cannot be used and a test using ranking must be used. Such a test is the nonparametric Mann–Whitney *U* test. All significances were corrected for multiple layer comparison with the Bonferroni method.⁴⁷ The study was designed for detecting, with a type 1 error probability of 5% ($\alpha = 0.05$) and a statistical power of 90% ($\beta = 0.1$), a 30% variation in total stromal cell density. This variation is relevant to assess whether the increased autofluorescence observed in diabetic corneas (+42% for level 20 diabetic retinopathy⁹) relates to changes of cellular density in stroma. For study design, reference values of cell densities and measurement variances were obtained from our previous study on healthy corneas that used the same measurement technique.³² The actual minimum detectable differences for all corneal layers were calculated from the sample size and measured variance and from the critical values of the *t* distribution, for the desired levels of significance ($\alpha = 0.05$, $\beta = 0.10$).⁴⁶ They represent the smallest difference that is detectable 90% of the time with a significance level of 95%.

For comparison between the average cell density of each of the 3 stromal layers (depths) in diabetic patients and healthy controls, a 2-way analysis of variance (ANOVA) procedure with post hoc between group comparisons using the Tukey test⁴⁶ was used if the distribution was normal. Otherwise, the Kruskal–Wallis test with nonparametric between-group comparisons using the Nemenyi test was used. A significance level of 0.05 was taken in all cases.

RESULTS

The clinical data of healthy controls and diabetic patients are given in Table 1. The mean age was not significantly different between diabetic patients and controls (2-sided Student *t* test, $P = 0.67$). All corneas were fully transparent and did not show signs of pathology.

No visible differences in morphology of cells between diabetic patients and healthy controls were found in each layer. The calculated cell densities in each layer along the optical axis of the cornea were normally distributed in healthy controls and diabetic patients according to the D’Agostino test for departure from normality. Because the interobserver repeatability was on average 7.2%, the results of both observers were averaged. The results are summarized in Tables 2–4.

TABLE 1. Clinical Data of Participants

	Healthy Controls	Diabetic Patients
Number	15	15
Sex	4 M, 11 F	9 M, 6 F
Age (mean ± SD) (yr)	59.3 ± 11.0*	60.9 ± 8.5*
Age (range) (yr)	35–74	39–69
Diabetes duration (mean ± SD) (yr)		11.3 ± 6.2
Diabetes duration (range) (yr)		2–20

*No significant differences between healthy controls and diabetic patients (2-tailed Student *t* test, $P = 0.672$).

The number of cells per unit area of superficial, basal epithelial, and endothelial layers; the number of cells per unit volume of the total stroma; and the relative differences between diabetic patients and healthy controls are given in Table 2. A highly significant lower density was found in the basal layer (–15.0%, $P = 0.0004$) in diabetic patients compared with healthy controls. No significant differences in cell density between healthy controls and diabetic patients were found in the other layers ($P > 0.07$).

The number of stromal cells (keratocytes) per unit volume (Table 3) was analyzed using a two-way ANOVA procedure, with the factors being disease state and stromal layer (depth). Post hoc between-group comparisons through the Tukey test were used. The analysis showed that the factor disease state (healthy or diabetic) has no effect on stromal cell density ($P = 0.067$; minimum detectable difference [MDD], 1090 cells/mm³). The factor stromal layer (depth) has a significant effect on stromal cell density, with the midstroma cell density being significantly lower than both the anterior and posterior stroma cell densities ($P < 0.0001$; MDD, 6540 cells/mm³). In other words, although cell densities in midstroma were lower than in anterior or posterior stroma in diabetic patients and healthy controls, no significant differences between both groups were found in equivalent stromal depths. No interaction between disease state and stromal layer was found ($P = 0.36$).

The differences in cell density between stromal layers (depths) were evaluated. Table 4 presents these results for healthy controls and diabetic patients. The results confirm that cell density in the midstroma is significantly lower than in the anterior and posterior stroma both in healthy controls and diabetic patients. The relative density differences between stromal layers (depths) were calculated for each individual. These samples were evaluated by a 2-factor ANOVA procedure with the factors being disease state (healthy or diabetic) and stromal layer variation and the variable being cell density variation. The results showed that the disease state factor had no influence on relative cell density variation ($P = 0.17$), although the relative density variation between mid- and posterior stroma densities is almost significantly lower ($P = 0.053$) in diabetic patients than in healthy controls.

DISCUSSION

The cell density values measured in the different corneal layers of healthy controls correspond to those previously found with the same instrument and measuring protocol.³² Because it is not excluded that the cell density at the periphery of the cornea, where the cornea is thicker, differs from that along the optical axis, the values measured may not be representative for the total layer.

All diabetic patients had level of retinopathy 20 ETDRS. Although most of the patients were on glycemic control, the presence of microaneurysms indicates that the patients were exposed to prolonged hyperglycemia, which is considered to be the primary cause of vascular changes in diabetic retinopathy.²

Superficial Epithelial Cells

No difference in superficial cell density between healthy controls and diabetic patients was found ($P = 0.27$). A higher

TABLE 2. Corneal Cell Densities in Healthy Controls and Diabetic Patients

Layer	Number per Unit Area (cells/mm ²)*		Number per Unit Volume (cells/mm ³)*†		Difference		
	Healthy Controls [Mean ± SD (%)]	Diabetic Patients [Mean ± SD (%)]	Healthy Controls (Mean ± SD)	Diabetic Patients (Mean ± SD)	Relative (%)	P‡	MDD§
Superficial epithelial	725 ± 171 (23.6)	815 ± 260 (31.9)	—	—	+12.4	0.5	270 (37.2%)
Basal epithelial	5950 ± 653 (11.0)	5060 ± 301 (5.9)	—	—	-15.0	0.0004	624 (10.5%)
Total stroma	180 ± 27.3 (15.2)	201 ± 18.9 (9.3)	19,980 ± 3031	22,360 ± 2088	+11.9	0.07	3194 (14.2%)
Endothelium	2690 ± 302 (11.2)	2660 ± 364 (13.7)	—	—	-1.5	>0.5	411 (15.2%)

*Average of both observers.

†Calculated from density per unit area by using an effective optical thickness of 9 μm.³²‡Two-tailed Student *t* test, corrected for multiple comparison between layers according to Bonferroni.§Minimum detectable difference: smallest difference that is detectable 90% of the time with a significance level of 95% ($\alpha = 0.05$, $\beta = 0.10$).

rate of turnover in basal epithelial cells of diabetic patients has previously been suggested,^{15,48} presumably implying an increased maturation and differentiation of these cells. In principle, this would result in a higher density of superficial cells in diabetic corneas. This possibility cannot be fully ruled out by our study because the MDD for superficial epithelial cell density amounts to 37% of the density measured in healthy controls.

Basal Epithelial Cells

The density of basal epithelial cells in diabetic patients was significantly lower than in healthy controls (-15%, $P = 0.0004$; Table 2). This result contradicts that of Frueh et al,²⁰ where no significant difference in basal cell density between diabetic patients and healthy controls was found, although their presented value for patients with diabetes was 13% lower than that for healthy controls. Note that Frueh et al²⁰ reported basal cell density values of healthy controls well below the values reported by us in another study³² and by other authors.⁴⁹⁻⁵¹

The steady-state cell density in any given compartment of the cornea is the result of tight regulation and balance between cell proliferation, differentiation, migration, and death. Although the data presented in this study do not provide a clear explanation for the decrease in basal cell density in diabetic patients, it may result from a combination of different mechanisms.

1. The decreased innervation, observed by confocal microscopy, at the subbasal nerve plexus of diabetic corneas^{24,25,52} can result in the depletion of basal cells because corneal epithelial metabolism depends on appropriate corneal

innervation.^{26,53} Corneal sensory nerves supply trophic neuropeptides, such as substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP), that increase the rate of mitosis of corneal epithelial cells in vitro and may modulate other aspects of epithelial cell behavior as differentiation and migration.^{54,55}

2. The metabolic dysfunctions associated with diabetes affect the basement membrane and the basal epithelial cells, interfering with the adhesive properties and hence the migration of these cells. In diabetic corneas, there is a reduction in the area of the basal cell membrane occupied by hemidesmosomes^{16,56} and altered cell-extracellular matrix (ECM) interactions.¹⁶ In vitro studies show that nonenzymatic glycation of fibronectin reduces the adhesion of epithelial cells to this ECM protein, suggesting that glycated proteins may interfere with attachment and migration of epithelial cells.⁵⁷ On the other hand, diabetic corneas also exhibit changes in adhesion complexes of the basement membrane. The reduction of components involved in adhesion complexes, such as nidogen-1/entactin, laminin-1, laminin-10, and of an epithelial integrin $\alpha_3\beta_1$ in diabetic cornea, is reported in several studies^{17,18,58} and may be the molecular mechanism leading to abnormalities in epithelial cell adhesion. An apparent increase in specific proteinase activity in the epithelial cells may also contribute to basement membrane and adhesion changes.^{58,59} In another study,⁶⁰ glycation of laminin has been shown to lead to a significant decrease of attached epithelial cells. Thus, impairment of cellular adhesion in diabetic corneas

TABLE 3. Cell Densities in the Stromal Layers for Diabetic Patients and Healthy Controls

Cell Type	Number per Unit Volume (cells/mm ³)*†	
	Healthy Controls [Mean ± SD (%)]	Diabetic Patients [Mean ± SD (%)]
Anterior stroma	26,300 ± 4090 (15.6)	27,560 ± 3880 (14.1)
Midstroma	19,390 ± 3120 (16.1)	21,930 ± 2110 (9.6)
Posterior stroma	25,700 ± 3260 (12.7)	25,790 ± 3090 (12.0)

*, † as in Table 2.

TABLE 4. Difference in Cell Density Between Stromal Layers (Depths)

Stromal Layers	Healthy Controls		Diabetic Patients	
	Difference (%)	Significance (P)*	Difference (%)	Significance (P)*
Mid- vs. anterior	-26.3	<0.001	-20.4	<0.001
Mid- vs. posterior	-24.6	<0.001	-15.0	<0.02
Posterior vs. anterior	-2.6	>0.5	-6.4	0.429
All 3 layers		<0.0005		<0.0005

*Two-factor ANOVA using multiple comparisons of average cell densities in the 3 stromal layers (depths).

is likely to interfere with cell migration and may contribute to the decrease in basal epithelial cell density observed in diabetic patients.

3. Diabetic corneal alterations include increased basement membrane thickness.^{4,5} The increased thickness was attributed to a higher rate of cell death and regeneration caused by focal degeneration of basal epithelial cells.^{15,48} Too rapid differentiation and maturation can contribute to the decrease of basal epithelial cell density.

Stromal Cells

In the stroma, measured cell densities are probably overestimated because the calculations of volumetric densities are based in the Abercrombie method, which tends to overestimate (5%–10%) whenever the cells or nuclei are not exact spherical structures.⁶¹ Because we used the same instrument and protocol for patients and controls, the calculated cell densities are still comparable between both groups.

The average SD in the 3 stromal layers (depths) was less than 16.1% for healthy controls and diabetic patients (Table 3), corresponding to that previously found for healthy controls (28.8%,⁶² 14%–31%⁴²). Within equivalent stromal cell layers, the ANOVA revealed no differences in cell densities between healthy controls and diabetic patients ($P = 0.067$). Interaction between factors disease state and stromal cell layer was not found.

The lower cell density in the midstroma of healthy controls, in comparison with the anterior (26.3%) and posterior stroma (24.6%), confirms previous observations in rabbits (a 30% decrease in cell density beneath the epithelium⁶³) and in healthy humans^{32,62} and is also observed in diabetic patients in this study. A possible explanation for this lower cell density in midstroma may be the lower availability of oxygen in the midstromal layer in comparison with the posterior and anterior stromal layers (depths) caused by the physiological limitation of oxygen diffusion from both the epithelial and the aqueous side.

The different oxygen concentration in the stromal depths may also, in part, be responsible for the different morphology of the keratocytes previously found.^{64,65}

An explanation for the less pronounced lower midstromal cell density in diabetic patients in comparison with healthy controls (15.0% and 24.6%, $P = 0.053$, respectively; Table 4) may be the increased glucose concentration in the diabetic cornea suggested by previous reports.^{60,66,67} Such an increase causes a higher rate of nonenzymatic glycation and consequently a higher level of AGEs.^{27,60} In vitro experiments with cultures of human dermal fibroblasts showed that AGEs upregulate connective tissue growth factor (CTGF).⁶⁸ CTGF is a potent profibrotic agent that can induce ECM components and increase fibroblast proliferation.⁶⁸ Thus, it is possible to suggest that the higher level of AGEs in diabetic corneas may lead to an elevated concentration of CTGF and an increase of fibroblast proliferation. Increased fibroblast proliferation amplifies the normally low nutritional state in the midstroma of diabetic patients, resulting in a higher keratocyte density compared with corneas of healthy individuals.

The cell density in anterior stroma of healthy controls and diabetic patients was higher than in posterior stroma. The

difference was not significant (2.6% in healthy controls, 6.4% in patients with diabetes), which contrasts with previous observations (+46%,⁶⁴ +31%,⁴² +22%,⁶² –15%,⁶⁹ –21%⁷⁰). The discrepancy can be attributed to the MDD of our study (6540 cells/mm³, which means that differences higher than 25% of anterior stroma cell density should be detected). It can also be attributed to a different definition of the posterior stroma or, in the latter study,⁷⁰ to the investigated disease (amiodarone-induced keratopathy).

No significant correlation between age and the lower midstromal cell density was found in healthy controls or diabetic patients. This outcome contrasts with previous observations in healthy volunteers^{42,62} but can be attributed to the low age range of our participants (~50–70 years).

Endothelial Cells

The mean density of corneal endothelial cells in the diabetic patients is not significantly different from that in healthy controls ($P > 0.5$; Table 2). This finding supports previous results by specular^{21,29,71,72} and confocal²⁰ microscopy. Other specular microscopy studies report a reduction (5%²³ and 4%²²) of the mean endothelial cell density in NIDDM diabetic patients compared with healthy controls. Our study does not reject such a reduction because, due to the small size of the sample, it does not have enough statistical power to detect a 5% difference (Table 2). Note that as specular and corneal confocal microscopy produce equivalent measurements of endothelial cell densities,^{35,37} the results obtained by any of the methods is valid.

Although some specular microscopy studies^{21–23,73} in diabetic corneas have found a higher polymegathism and pleomorphism, others found no differences^{33,74} or differences only for type 1 diabetes.²⁹ It was suggested that the discrepancy between these findings resulted from different duration and severity of the disease or different disease control.⁷⁴ Different studies on patients, with similar disease duration and severity, report different findings.^{23,73,74} Morphologic differences were found even in patients with good glycemic control.²³

Because polymegathism and pleomorphism also increase with age,⁷⁵ the morphologic differences between diabetic patients and age-matched healthy controls are lower in older age groups. This explanation was used to justify the absence of morphologic differences between controls and type 2 diabetic patients.²⁹ However, at least 1 study⁷³ found morphologic differences for all age groups, both in type 1 and type 2 diabetic patients.

The discrepancy on the findings of endothelial morphologic differences may also be caused by insufficient statistical power of some studies⁷⁴ and by the variety of methods used to determine endothelial cell area and shape. Reported endothelial morphologic changes were not always detectable by visual inspection and required the use of computer-assisted morphometric tools.⁷³

In our study, no visible differences in morphology of cells between diabetic patients and healthy controls were found. The same result was found in another study based on confocal microscopy.⁷⁶ Neither study used computer-assisted morphometric tools.

Conclusions

This study provides in vivo values of cell densities in 6 layers (depths) along the optical axis of the cornea of healthy controls and patients with NIDDM. The difference in cell densities between diabetic patients and healthy controls in the different layers of the cornea is significant in the basal layer (-15.0% , $P < 0.001$) but not in the other layers. The lower basal cell density in patients with diabetes may result from a combination of different mechanisms including decreased innervation at the subbasal nerve plexus, basement membrane alterations, and higher turnover rate in basal epithelial cells. A significant lower cell density was found in midstroma of both diabetic patients and healthy controls, in comparison with anterior and posterior stromal layers, which might, in part, be attributed to differences in oxygen concentration. It is possible that no differences in cell density were found in all layers except the basal epithelial because of the low level of retinopathy of the diabetic patients.

The level of retinopathy of the diabetic patients was 20 ETDRS, corresponding to grade 2 of the Modified Airlie House classification.⁴⁴ In a previous study,⁹ the mean corneal autofluorescence for this grade was 16.3 ± 4.3 ng of equivalent fluorescein/mL, whereas the value for healthy controls was 11.4 ± 2.8 . This value is equivalent to an autofluorescence increase of 42% ($P < 0.004$). Because the raised autofluorescence in the diabetic cornea is homogeneously distributed over the whole cornea,⁷⁷ and an increase of cellular density in the total stroma (compared with healthy controls) of 11.9% ($P = 0.07$, Table 2) was found in this study, changes of cellular density in stroma are probably not responsible for the increased autofluorescence. Changes in the basal epithelial cellular density can be excluded as well, because of the homogeneous autofluorescence distribution over the cornea.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr G.F.J.M. Vrensen from the Department of Ophthalmology of Leiden University Medical Center (The Netherlands) for carefully reading the manuscript, Cristina Ramos from the Ophthalmology Department at the Coimbra University for checking the English syntax and grammar, and Viktoria Szabo, MD, and Lajos R. Kozak, MD, MSc, from Semmelweis University, Budapest, Hungary, for technical assistance.

REFERENCES

- Merimee TJ. Diabetic retinopathy. A synthesis of perspectives. *N Engl J Med.* 1990;322:978–983.
- Fong DS, Aiello LP, Ferris FL III, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2004;27:2540–2553.
- Didenko TN, Smoliakova GP, Sorokin EL, et al. Clinical and pathogenetic features of neurotrophic corneal disorders in diabetes. *Vestn Oftalmol.* 1999;115:7–11.
- Sanchez-Thorin JC. The cornea in diabetes mellitus. *Int Ophthalmol Clin.* 1998;38:19–36.
- Herse PR. A review of manifestations of diabetes mellitus in the anterior eye and cornea. *Am J Optom Physiol Opt.* 1988;65:224–230.
- Saini JS, Khandalavla B. Corneal epithelial fragility in diabetes mellitus. *Can J Ophthalmol.* 1995;30:142–146.
- McNamara NA, Brand RJ, Polse KA, et al. Corneal function during normal and high serum glucose levels in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:3–17.
- Touzeau O, Levet L, Borderie V, et al. Anterior segment of the eye and diabetes mellitus. *J Fr Ophthalmol.* 2004;27:859–870.
- Stolwijk TR, Van Best JA, Oosterhuis JA, et al. Corneal autofluorescence: an indicator of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33:92–97.
- Kessel L, Moldow B, Van Best JA, et al. Corneal autofluorescence in relation to permeability of the blood aqueous barrier in diabetic patients with clinically significant macular edema and in an age-matched control group. *Curr Eye Res.* 2003;26:307–312.
- Schultz RO, Van Horn DL, Peters MA, et al. Diabetic keratopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1981;79:180–199.
- Gekka M, Miyata K, Nagai Y, et al. Corneal epithelial barrier function in diabetic patients. *Cornea.* 2004;23:35–37.
- Saini JS, Mittal S. In vivo assessment of corneal endothelial function in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol.* 1996;114:649–653.
- Taylor HR, Kimsey RA. Corneal epithelial basement membrane changes in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;20:548–553.
- Rehany U, Ishii Y, Lahav M, et al. Ultrastructural changes in corneas of diabetic patients: an electron-microscopy study. *Cornea.* 2000;19:534–538.
- Azar DT, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, et al. Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. *Arch Ophthalmol.* 1992;110:537–540.
- Ljubimov AV, Huang ZS, Huang GH, et al. Human corneal epithelial basement membrane and integrin alterations in diabetes and diabetic retinopathy. *J Histochem Cytochem.* 1998;46:1033–1041.
- Kabosova A, Kramerov AA, Aoki AM, et al. Human diabetic corneas preserve wound healing, basement membrane, integrin and MMP-10 differences from normal corneas in organ culture. *Exp Eye Res.* 2003;77:211–217.
- Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;214:793–797.
- Frueh BE, Komer U, Bohnke M. Confocal microscopy of the cornea in patients with diabetes. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1995;206:317–319.
- Keoleian GM, Pach JM, Hodge DO, et al. Structural and functional studies of the corneal endothelium in diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol.* 1992;113:64–70.
- Inoue K, Kato S, Inoue Y, et al. The corneal endothelium and thickness in type II diabetes mellitus. *Jpn J Ophthalmol.* 2002;46:65–69.
- Roszkowska AM, Tringali CG, Colosi P, et al. Corneal endothelium evaluation in type I and type II diabetes mellitus. *Ophthalmologica.* 1999;213:258–261.
- Rosenberg ME, Tervo TM, Immonen IJ, et al. Corneal structure and sensitivity in type I diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2915–2921.
- Popper M, Quadrado MJ, Morgado AM, et al. Subbasal nerves and highly reflective cells in corneas of diabetic patients: in vivo evaluation by confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:2194.
- Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, et al. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:418–422.
- Sato E, Mori F, Igarashi S, et al. Corneal advanced glycation end products increase in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2001;24:479–482.
- Rovati L, Fankhauser F II, Docchio F, et al. Diabetic retinopathy assessed by dynamic light scattering and corneal autofluorescence. *J Biomed Opt.* 1998;3:357–363.
- Larsson LI, Bourne WM, Pach JM, et al. Structure and function of the corneal endothelium in diabetes mellitus type I and type II. *Arch Ophthalmol.* 1996;114:9–14.
- Van Schaik HJ, Benitez del Castillo JM, Cauberg MJ, et al. Evaluation of diabetic retinopathy by fluorophotometry. European concerted action on ocular fluorometry. *Int Ophthalmol.* 1998;22:97–104.
- Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:359–389.
- Popper M, Morgado AM, Quadrado MJ, et al. Corneal cell density measurement in vivo by scanning-slit confocal microscopy: method and validation. *Ophthalmic Res.* 2004;36:270–276.
- Shetlar DJ, Bourne WM, Campbell RJ. Morphologic evaluation of Descemet's membrane and corneal endothelium in diabetes mellitus. *Ophthalmology.* 1989;96:247–250.

34. Janiec S, Rzendkowski M, Bolek S. The relation between corneal autofluorescence, endothelial cell count and severity of the diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol*. 1994;18:205-209.
35. Hara M, Morishige N, Chikama T, et al. Comparison of confocal biomicroscopy and noncontact specular microscopy for evaluation of the corneal endothelium. *Cornea*. 2003;22:512-515.
36. Modis L Jr, Langenbacher A, Seitz B. Corneal endothelial cell density and pachymetry measured by contact and noncontact specular microscopy. *J Cataract Refract Surg*. 2002;28:1763-1769.
37. Klais CM, Bühren J, Kohnen T. Comparison of endothelial cell count using confocal and contact specular microscopy. *Ophthalmologica*. 2003; 217:99-103.
38. Cavanagh HD, El Agha MS, Petroll WM, et al. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea*. 2000;19:712-722.
39. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, et al. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:225-236.
40. Imre L, Nagymihály A. Reliability and reproducibility of corneal endothelial image analysis by in vivo confocal microscopy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;239:356-360.
41. Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, et al. Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:320-326.
42. Patel S, McLaren J, Hodge D, et al. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:333-339.
43. Masters BR, Bohnke M. Three-dimensional confocal microscopy of the living human eye. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002;4:69-91.
44. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs—an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. (5 Suppl.) *Ophthalmology*. 1991;98:786-806.
45. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96:379-394.
46. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliff, NJ: Prentice-Hall; 1984.
47. Weisstein EW. Bonferroni correction. Available at: <http://mathworld.wolfram.com/BonferroniCorrection.html>. Accessed June 15, 2004.
48. Vracko R. Basal lamina layering in diabetes mellitus. Evidence for accelerated rate of cell death and cell regeneration. *Diabetes*. 1974;23: 94-104.
49. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, et al. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea*. 1998;17:485-492.
50. Harrison DA, Joos C, Ambrosio JR. Morphology of corneal basal epithelial cells by in vivo slit-scanning confocal microscopy. *Cornea*. 2003;22:246-248.
51. Vanathi M, Tandon R, Sharma N, et al. In-vivo slit scanning confocal microscopy of normal corneas in Indian eyes. *Indian J Ophthalmol*. 2003; 51:225-230.
52. Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA, et al. Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia*. 2003;46:683-688.
53. Beuerman RW, Schimmelpennig B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol*. 1980;69:196-201.
54. Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C. Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 1994;59:597-605.
55. Reid TW, Murphy CJ, Iwahashi CK, et al. Stimulation of epithelial cell growth by the neuropeptide substance P. *J Cell Biochem*. 1993;52: 476-485.
56. Tabatabay CA, Bumbacher M, Baumgartner B, et al. Reduced number of hemidesmosomes in the corneal epithelium of diabetics with proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1988;226: 389-392.
57. McDermott AM, Xiao TL, Kern TS, et al. Non-enzymatic glycation in corneas from normal and diabetic donors and its effects on epithelial cell attachment in vitro. *Optometry*. 2003;74:443-452.
58. Saghizadeh M, Brown DJ, Castellon R, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-10 and matrix metalloproteinase-3 in human diabetic corneas: a possible mechanism of basement membrane and integrin alterations. *Am J Pathol*. 2001;158:723-734.
59. Saghizadeh M, Kramerov AA, Tajbakhsh J, et al. Proteinase and growth factor alterations revealed by gene microarray analysis of human diabetic corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:3604-3615.
60. Kaji Y, Usui T, Oshika T, et al. Advanced glycation end products in diabetic corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:362-368.
61. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*. 1946;94:239-247.
62. Berlau J, Becker HH, Stave J, et al. Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas—a study using scanning-slit confocal microscopy in vivo. *J Cataract Refract Surg*. 2002;28:611-616.
63. Petroll WM, Boettcher K, Barry P, et al. Quantitative assessment of anteroposterior keratocyte density in the normal rabbit cornea. *Cornea*. 1995;14:3-9.
64. Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, et al. The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*. 2000;19:185-193.
65. Muller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:2557-2567.
66. Foulks GN, Thoft RA, Perry HD, et al. Factors related to corneal epithelial complications after closed vitrectomy in diabetics. *Arch Ophthalmol*. 1979;97:1076-1078.
67. Davies PD, Duncan G, Pynsent PB, et al. Aqueous humour glucose concentration in cataract patients and its effect on the lens. *Exp Eye Res*. 1984;39:605-609.
68. Twigg SM, Chen MM, Joly AH, et al. Advanced glycosylation end products up-regulate connective tissue growth factor (insulin-like growth factor-binding protein-related protein 2) in human fibroblasts: a potential mechanism for expansion of extracellular matrix in diabetes mellitus. *Endocrinology*. 2001;142:1760-1769.
69. Grupcheva C, Craig J, Sherwin T, et al. Stereological analysis of keratocyte density in the human cornea using in vivo confocal microscopy as an optical dissector. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:S281, ARVO abstract 1524.
70. Ciancaglini M, Carpineto P, Zuppari E, et al. In vivo confocal microscopy of patients with amiodarone-induced keratopathy. *Cornea*. 2001;20:368-373.
71. Matsuda M, Ohguro N, Ishimoto I, et al. Relationship of corneal endothelial morphology to diabetic retinopathy, duration of diabetes and glycaemic control. *Jpn J Ophthalmol*. 1990;34:53-56.
72. Pardos GJ, Krachmer JH. Comparison of endothelial cell density in diabetics and a control population. *Am J Ophthalmol*. 1980;90:172-174.
73. Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, et al. Corneal endothelial changes in type I and type II diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol*. 1984;98:401-410.
74. Weston BC, Bourne WM, Polse KA, et al. Corneal hydration control in diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:586-595.
75. Carlson KH, Bourne WM, McLaren JW, et al. Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. *Exp Eye Res*. 1988;47:27-41.
76. Morishige N, Chikama TI, Sassa Y, et al. Abnormal light scattering detected by confocal biomicroscopy at the corneal epithelial basement membrane of subjects with type II diabetes. *Diabetologia*. 2001;44:340-345.
77. Van Schaik HJ, Coppens J, Van den Berg TJ, et al. Autofluorescence distribution along the corneal axis in diabetic and healthy humans. *Exp Eye Res*. 1999;69:505-510.

Avaliação da Microanatomia do Limbo

Esmeralda Costa¹, Luís Cristóvão¹, Isabel Garrido², Júlia Veríssimo³, Maria João Quadrado⁴, Rui Proença⁵, Joaquim Neto Murta⁶

¹Assistente Hospitalar de Oftalmologia; Licenciatura em Medicina

²Técnica de Anatomia Patológica de 1ª Classe; Licenciatura em Anatomia Patológica

³Assistente Hospitalar Graduada de Oftalmologia; Licenciatura em Medicina

⁴Assistente Hospitalar Graduada de Oftalmologia; Mestrado em Medicina

⁵Chefe de Serviço de Oftalmologia; Professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

⁶Director do Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra; Professor Agregado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Centro de Responsabilidade Integrado de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra EPE
Banco de Olhos do Centro de Responsabilidade Integrado dos Hospitais da Universidade de Coimbra EPE

CRI de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra EPE
Praceta Mota Pinto - 3049 Coimbra, Portugal
Telefone +351 230 70 11 82
E-mail: anaesmeralda@hotmail.com

Trabalho apresentado no 53º Congresso da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia.
Prémio SPO/Bausch&Lomb para a melhor apresentação na área de cirurgia do segmento anterior.

Nenhum dos autores tem interesses comerciais.

RESUMO

Introdução: Várias evidências clínicas e experimentais sugerem que as células precursoras do epitélio corneano se encontram no limbo, o que levou ao surgimento de novas técnicas cirúrgicas, nomeadamente transplantes querato-límbicos e enxertos celulares expandidos ex vivo. As palissadas de Vogt são as estruturas anatomo-funcionais onde é pressuposto que estas células se encontram. No entanto, três estruturas da microanatomia do limbo foram recentemente descritas como potencial nicho de células estaminais: as criptas epiteliais límbicas¹, as criptas límbicas e as projecções focais estromais². Numa era em que as terapias celulares ganham importância crescente no tratamento da insuficiência límbica, a utilização de métodos de imagem não invasivos para realização de biópsias dirigidas poderá revelar-se essencial para o sucesso dos transplantes de células expandidas ex vivo².

Objectivo: Avaliar a microanatomia do limbo através de biomicroscopia, microscopia confocal e histologia e estabelecer correspondências entre as várias técnicas.

Material e métodos: Foram avaliados treze anéis corneoesclerais de nove doadores de córnea, provenientes do Banco de Olhos do Serviço de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Em todos eles foram realizados exame biomicroscópico e fotografia de segmento anterior com o objectivo de identificar palissadas de Vogt. De seguida, foi realizada microscopia confocal (Heidelberg Retinal Tomograph II® - Rostock Cornea Module®) e, posteriormente, exame histológico. Foram realizados cortes de 2 a 4 µm de espessura e as lâminas coradas com hematoxilina-eosina. A presença de palissadas de Vogt, criptas epiteliais límbicas, criptas límbicas e projecções focais estromais foi registada. As imagens da

microscopia confocal foram comparadas com os cortes histológicos.

Resultados: Dos 13 olhos, em apenas oito (seis dadores) foi possível detectar a presença de palissadas de Vogt ao exame biomicroscópico. Nestes casos, estas estruturas foram identificadas também através de microscopia confocal e/ou histologia. Nos restantes cinco anéis, estas estruturas foram identificadas apenas com recurso a microscopia confocal (3 olhos) e/ou histologia (5 olhos). Foram identificadas criptas límbicas sempre que se detectaram palissadas na microscopia confocal (n=10). As criptas epiteliais límbicas foram apenas observadas em cortes histológicos (n=3).

Conclusões: A microscopia confocal é útil na identificação de microestruturas límbicas com detalhe quasi histológico, com um maior grau de certeza do que a avaliação biomicroscópica. É um método simples e não invasivo que permite avaliar o limbo *in vivo* bem como em tecidos de bancos de olhos, podendo, dessa forma, contribuir para o diagnóstico e tratamento de várias condições clínicas.

Palavras-chave

Microanatomia do limbo; insuficiência límbica; palissadas de Vogt; criptas epiteliais límbicas; projecções focais estromais.

ABSTRACT

Introduction: Several clinical and experimental evidence suggest that corneal epithelial precursors are located at the limbus. This has led to the development of new surgical techniques, namely kerato-limbal grafts and *ex vivo* expanded stem cell transplants. Limbal palisades of Vogt are the anatomic and functional structures thought to harbour these cells. Recently, three structures of limbal microanatomy were described as potential stem cell niche: limbal epithelial crypts¹, limbal crypts and focal stromal projections². In an era where cell therapy gains importance in the treatment of limbal insufficiency, non-invasive imaging methods to perform guided biopsies may become essential to the success of *ex vivo* expanded stem cell transplants².

Objective: to evaluate the limbal microanatomy with confocal microscopy and histology and establish correspondences between the two techniques.

Material and methods: Thirteen corneoscleral rings from nine organ donors stored in Coimbra's University Hospital Eye Bank were evaluated. All underwent biomicroscopic evaluation and anterior segment photography, in order to identify palisades of Vogt. Then, confocal microscopy was performed (Heidelberg Retinal Tomograph II® - Rostock Cornea Module®) and 2-4 µm thick cuts were obtained for histology. The presence of palisades of Vogt, limbal epithelial crypts, limbal crypts and focal stromal projections was recorded. Confocal images were compared with histological cuts.

Results: Palisades of Vogt were detected on biomicroscopy in only eight out of 13 eyes (six donors). In these eight cases, these structures were also identified in confocal microscopy and/or histology. In the remaining five rings, these structures were detected only with confocal microscopy (3 eyes) and/or histology (5 eyes). Limbal crypts were identified on confocal microscopy whenever palisades were detected (10 eyes). Limbal epithelial crypts were only observed on histology (3 eyes).

Conclusions: Confocal microscopy is useful in the identification of limbal microstructures with great detail and is more reliable than biomicroscopy. It is a simple and non invasive method that allows evaluation of the limbus *in vivo*, as well as in eyebank tissue. In this way, it can contribute to the diagnosis and treatment of several clinical conditions.

Key-words

Limbal microanatomy; limbal insufficiency; palisades of Vogt; limbal epithelial crypts; focal stromal projections.

INTRODUÇÃO

A integridade límbica é fundamental para a manutenção da estrutura e função do epitélio corneano, contribuindo para a recuperação daquelas sempre que ocorre qualquer agressão ao epitélio corneano. Esta e outras evidências clínicas e experimentais sugerem que as células precursoras do epitélio corneano se encontram no limbo³⁻⁶, o que levou ao surgimento de novas técnicas cirúrgicas, nomeadamente transplantes querato-límbicos e enxertos celulares expandidos ex vivo.

As palissadas de Vogt foram descritas pela primeira vez em 1921 por Vogt, quando as observou à lâmpada de fenda⁷. São projecções papilares de tecido conjuntivo que partem do estroma da conjuntiva, estão recobertas por epitélio e encontram-se mais frequentemente no limbo superior e inferior, estando praticamente ausentes no meridiano horizontal^{7,8}. São as estruturas anatomo-funcionais do limbo há muito apontadas como o local onde as células precursoras do epitélio corneano se encontram. A hipótese de que estas células são uma sub-população da camada basal do epitélio que recobre as palissadas continua a ser a mais aceite^{3,9}.

No entanto, três estruturas da microanatomia do limbo foram recentemente descritas como potencial nicho de células estaminais. Dua *et al.*, em 2005, com base em estudos histológicos e de imunohistoquímica, demonstrou a presença de umas estruturas que denominou de criptas epiteliais límbicas (CEL)¹. Estas são projecções de cordões celulares a partir da superfície mais profunda e periférica da palissada, com disposição radiária ou circunferencial. As células das CEL demonstram positividade para a citoqueratina 14 (CK14 – marcador do fenótipo epitelial) e para a proteína de transporte transmembranar ABCG2 (presumível marcador de célula estaminal). Mais tarde, Shortt *et al.* em 2007, com base em estudos de microscopia confocal, microscopia de varrimento electrónico e imunofluorescência, descreveu as criptas límbicas (CL) e as projecções focais estromais (PFE)². As CL são, segundo estes autores, invaginações de células epiteliais estendendo-se da córnea periférica para o limbo, rodeadas por estroma altamente celular com rede vascular própria. As PFE são projecções do estroma em

forma de dedo de luva até ao epitélio límbico que contém um vaso sanguíneo central e são rodeadas por uma camada compacta de células pequenas. As células basais das CL e as células que rodeiam as PFE seriam células precursoras do epitélio corneano, demonstrando positividade para o factor de transcrição p63 e a proteína ABCG2, dois presumíveis marcadores de células estaminais¹⁰.

Numa era em que as terapias celulares ganham importância crescente no tratamento da insuficiência límbica, a utilização de métodos de imagem não invasivos para realização de biópsias dirigidas poderá revelar-se essencial para o sucesso dos transplantes de células expandidas ex vivo².

OBJECTIVO

Avaliar a microanatomia do limbo através de microscopia confocal e histologia e estabelecer correspondências entre as duas técnicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados nove anéis córneo-esclerais, dois botões córneo-esclerais e dois globos oculares de nove doadores, provenientes do Banco de Olhos do Serviço de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Os anéis foram usados após trepanação da córnea para transplante. Os botões e os globos oculares tinham sido considerados não adequados para transplantação (critérios de exclusão: serologias infecciosas positivas). A idade dos doadores variou entre 31 e 75 anos (média 52 anos). O tempo médio de permanência em banco de olhos foi de 5 dias, com um máximo de 9 dias. Os anéis foram mantidos em meio de conservação Eusol-C[®], a uma temperatura de +4°C.

Em todos eles foram realizados exame biomicroscópico e fotografia de segmento anterior com o objectivo de identificar palissadas de Vogt. Posteriormente, foram avaliados por microscopia confocal (Heidelberg Retinal Tomograph II[®] - Rostock Cornea Module[®]), obtendo-se secções simples, sequenciais e de volume. Todos os exames foram

realizados pelo mesmo investigador. As peças foram fixadas em formaldeído a 10% por um período mínimo de 24 horas e incluídas em parafina. Foram feitos cortes histológicos de 2 a 4 μm de espessura e as lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Em quatro peças foram realizados cortes em três planos (radiários ou longitudinais, tangenciais ou paralelos à superfície e coronais, i.e., perpendiculares aos anteriores) e em nove apenas cortes radiários. As fotografias de segmento anterior, as imagens obtidas por microscopia confocal e as lâminas histológicas foram avaliadas por dois investigadores de forma independente. A presença de palissadas de Vogt, criptas epiteliais límbicas, criptas límbicas e projecções focais estromais foi registada. As imagens da microscopia confocal foram comparadas com os cortes histológicos.

RESULTADOS

As palissadas de Vogt são linhas paralelas de finas cristas longitudinais localizadas no limbo e dispostas radialmente em torno da superfície corneana⁸. Estas foram facilmente detectadas à biomicroscopia em oito dos 13 anéis (61,5%) por ambos os investigadores (Fig 1). Nestes casos, estas estruturas foram identificadas também através de microscopia confocal e/ou histologia (tabela 1).



Fig. 1 | Palissadas de Vogt visíveis à biomicroscopia.

De salientar que nos dois globos oculares (dador B) e nos dois botões córneo-esclerais (dador I), as palissadas eram bem visíveis. Dos nove anéis córneo-esclerais, em cinco (38,5% do total) a sua presença foi considerada duvidosa pelos dois investigadores. Nestes cinco casos, a microscopia confocal permitiu identificá-las em três (23,1% do total). Nos outros dois, a sua presença apenas foi detectada histologicamente.

As palissadas de Vogt são projecções do estroma conjuntival em forma de dedo de luva na transição córneo-conjuntival que, na microscopia confocal, se identificam como estruturas hiperreflectivas, lineares e paralelas, recobertas por uma camada de células hiperreflectivas¹¹ (Fig 2). Podem também apresentar-se como estruturas ovais ou em forma de anel quando captadas obliquamente ou de topo¹¹ (Fig 2). Na nossa série, foram identificadas por microscopia confocal em dez olhos (76,9%).

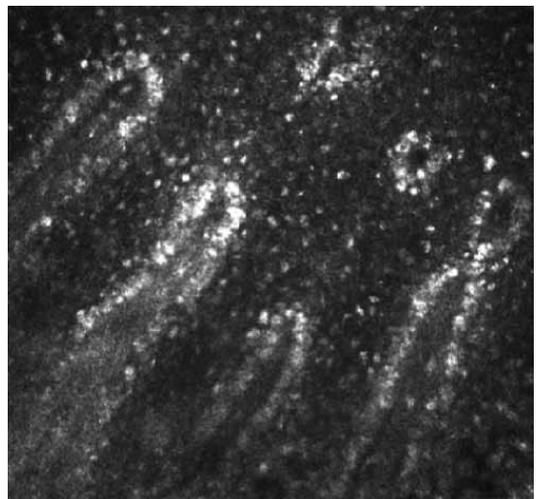


Fig. 2 | Palissadas de Vogt: estruturas lineares e em anel, recobertas por camada de células hiperreflectiva.

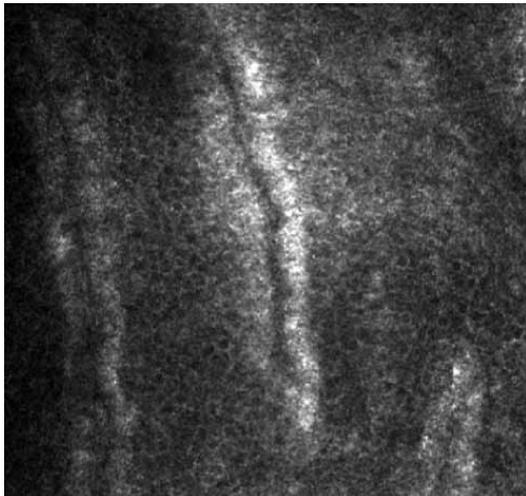
O espaço entre as palissadas é ocupado por várias camadas de células epiteliais escuras com bordos hiperreflectivos, que, em cortes paralelos à superfície, formam aglomerados celulares delimitados pelas palissadas de Vogt (Fig 3). Estas estruturas são em tudo semelhantes às CL descritas por Shortt *et al.* 2007² e foram observadas nos olhos em que se detectaram palissadas (n=10).

Histologicamente, as palissadas de Vogt são projecções papilares de tecido conjuntivo laxo, formado por fibras de colagénio sub-epitelial e fibroblastos fusiformes,

Tabela 1 | Resumo dos achados da biomicroscopia, microscopia confocal e histologia

Dador	Idade (a)	Olho	Tempo (d)	Biomicroscopia	M. Confocal		Histologia	
				B. Olhos	P. Vogt	P. Vogt	CL	P. Vogt
A / OD	55	1	6	S	S	S	S	S
A / OE	55	2	8	duvidoso	S	S	S	N
B / OD*	65	3	0	S	S	S	S	N
B / OE*	65	4	0	S	S	S	S	N
C / OD	43	5	5	duvidoso	N	N	S	N
D / OD	46	6	5	S	N	N	S	N
D / OE	46	7	5	duvidoso	S	S	S	N
E / OD	75	8	1	S	S	S	S	N
F / OD	54	9	7	duvidoso	S	S	S	S
G / OD	42	10	6	duvidoso	N	N	S	S
H / OD	31	11	4	S	S	S	S	N
I / OE**	50	12	9	S	S	S	S	N
I / OD**	50	13	9	S	S	S	N	N

(OD – olho direito; OE – olho esquerdo; a – anos; d – dias; M. Confocal – microscopia confocal; B. Olhos – banco de olhos; P. Vogt – palissadas de Vogt; CL – criptas limbicas; CEL – criptas epiteliais limbicas; S – sim, N – não) * - globo ocular; ** - botão córneo-escleral.

**Fig. 3 |** Entre as palissadas, observam-se aglomerados celulares.

delimitadas por uma camada de células basais⁸ (Fig. 4 e 5). São recobertas por um epitélio estratificado, que contém melanócitos^{8,11} (Fig. 6). Na nossa série, foram identificadas em 12 dos 13 olhos. No anel nº 13, apesar de se terem

identificado palissadas na biomicroscopia e na microscopia confocal, não foi possível observá-las na histologia porque houve desprendimento de todo o epitélio corneano e limbico durante o processamento da peça.

Para além destas estruturas, foi possível detectar a presença de CEL em três dos 13 olhos (23,1%), mas apenas nos cortes histológicos (Fig. 7).

DISCUSSÃO

As palissadas de Vogt, como estruturas macroscópicas, nem sempre são visíveis. Na nossa série, a sua presença foi considerada duvidosa ou não houve concordância entre os dois investigadores, em cinco dos anéis. De facto, estas estruturas nem sempre são detectáveis na população normal^{8,11}. Outras causas plausíveis para a sua ausência poderão ser artefactos causados pela permanência no meio de conservação ou a inexistência de conjuntiva suficiente por ter sido removida durante o processamento. Durante a trepanação da córnea, a conjuntiva é meticulosamente removida e com ela certamente grande parte destas estruturas. De facto, nos globos oculares não processados (dador B) e nos botões córneo-esclerais (não trepanados – dador I),

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Esmeralda Costa, Luís Cristóvão, Isabel Garrido, Júlia Veríssimo, Maria João Quadrado, Rui Proença, Joaquim Neto Murta

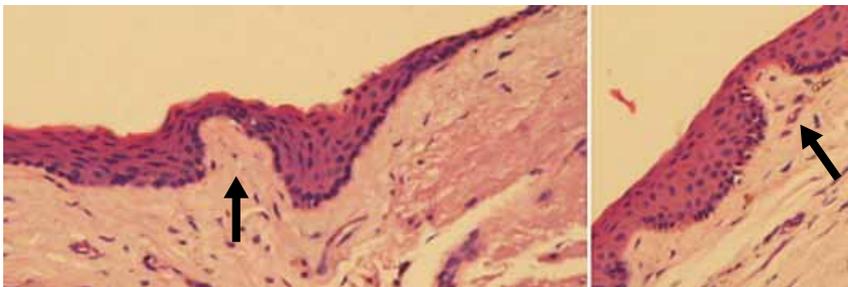


Fig. 4 e 5 | Palissada de Vogt (corte radiário e perpendicular; coloração HE; 10x).

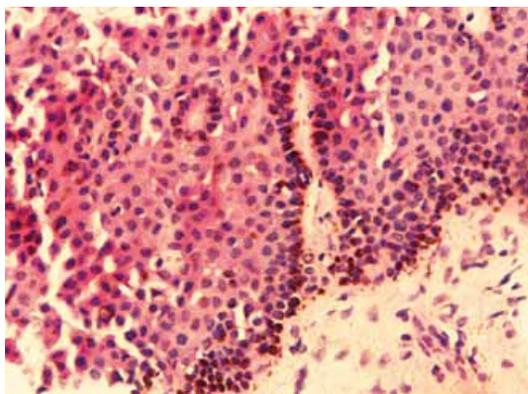


Fig. 6 | Melanócitos na camada basal do epitélio límbico (HE; 10x).



Fig. 7 | Cripta epitelial límbica (corte radiário, coloração HE; 10x).

a conjuntiva remanescente permitiu a fácil identificação das palissadas de Vogt. Já nos anéis obtidos após trepanação da córnea, a sua identificação foi duvidosa em mais de metade dos casos. Por esse motivo, alguns autores aconselham a manter os 2-3 mm de conjuntiva perilímbica quando se pretende realizar transplante de limbo¹². Por outro lado, não sendo visíveis à biomicroscopia, podem existir a nível

microscópico⁸, o que torna este exame insuficiente para a sua identificação.

A microscopia confocal ajudou a identificar palissadas de Vogt em 60% (3/5) dos falsos negativos do exame biomicroscópico. Nos restantes oito olhos, confirmou, com uma excepção (anel nº 6), os achados biomicroscópicos. Desta forma, permitiu um diagnóstico correcto em 76,9% dos casos.

A histologia permitiu detectar a presença destas estruturas em todos os olhos, excepto no nº 13, pois houve perda do epitélio durante o processamento da peça. Neste caso, as palissadas eram macroscopicamente evidentes, bem como na microscopia confocal. De salientar ainda que o olho adelfo do mesmo indivíduo (anel nº 12) apresentava palissadas evidentes na biomicroscopia, na microscopia confocal e no exame histológico.

Verificou-se, assim, que a capacidade de detecção destas estruturas com a microscopia confocal (10 olhos - 76,9%) e no exame histológico (12 olhos - 92,3%) era semelhante e bastante superior à avaliação biomicroscópica (8 olhos - 61,5%).

Relativamente às três microestruturas recentemente descritas, conseguimos identificá-las na nossa série. Imagens compatíveis com as CL e as PFE foram obtidas através de microscopia confocal e histologia. Já as CEL só foram detectadas ao exame histológico.

As CL descritas por Shortt *et al.*² parecem corresponder às “*rete ridges*” descritas por Townsend em 1991⁸, isto é, são projecções de epitélio estratificado para a profundidade, na direcção do estroma, envoltas por estroma altamente celular que forma elevações papilares (as palissadas de Vogt, segundo Townsend). O facto de as células na sua camada basal demonstrarem positividade para o factor de transcrição p63 e proteína transportadora ABCG2 é mais um elemento a favor da localização de células precursoras do epitélio corneano no limbo, sejam elas células amplificadoras transitórias ou células estaminais, hipótese postulada

pela primeira vez por Davanger e Evensen em 1971³. Este facto está de acordo com as observações de outros autores que localizam estas células precursoras à camada basal do epitélio límbico^{6,9}. Quanto às PFE, a descrição feita pelos próprios autores é sobreponível à definição de palissada de Vogt: projecções estromais em dedo de luva rodeadas por uma camada compacta de células pequenas – e que corresponde à camada basal do epitélio límbico.

As CEL descritas por Dua *et al.*¹ foram detectadas na nossa série, embora raramente (n=3). O facto de não terem sido realizados cortes histológicos seriados provavelmente justifica a baixa frequência com que estas estruturas foram observadas. Esse será também o motivo pelo qual Shortt *et al.*² em 2007, não encontrou essas estruturas em nenhum dos 38 olhos examinados. Segundo Dua *et al.*¹, existem em média cerca de 6 CEL por olho, que serão melhor individualizadas por imunohistoquímica, que não foi feito na nossa série. As CEL não foram, contudo, identificadas na microscopia confocal. As estruturas descritas por Dua *et al.*¹ foram observadas em cortes histológicos radiários e com esta técnica de imagem *in vivo* não é possível obter esses cortes. Existe na literatura, uma imagem de microscopia confocal descrita como podendo corresponder a uma CEL¹³, mas esta assumption é empírica. Será útil localizar estas estruturas em cortes histológicos tangenciais para posteriormente identificar imagens compatíveis à microscopia confocal.

CONCLUSÕES

A microscopia confocal é extremamente útil na identificação de microestruturas límbicas com detalhe quasi histológico, com um grau de certeza semelhante ao do exame anatomo-patológico e superior à avaliação biomicroscópica. É um método simples e não invasivo que permite avaliar o limbo *in vivo* bem como em tecidos de Bancos de Olhos, podendo, dessa forma, contribuir para o diagnóstico e tratamento de várias condições clínicas.

REFERÊNCIAS

1. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, et al. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical Structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 2005;89:529-532.
2. Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, et al. Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells. *Stem cells* 2007;25:1402-1409.
3. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971;229:560-1.
4. Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-23.
5. Lauwerins B, Van Den Oord JJ, Missotten L. The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:1991-9.
6. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64-K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-54.
7. Vogt A. The limbus. In: *Textbook and Atlas of Slit Lamp Microscopy of the Living Eye*. 3 ed. Wayenborgh: Bonn-Bad Godsberg, 1921; p.52-3 .
8. Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. *Tr Am Ophth Soc* 1991;721-756.
9. Cotsarelis G, Cheng S, Dong G, Sun T, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989;57:201-209.
10. O'Sullivan F, Clynes M. Limbal stem cells, a review of their identification and culture for clinical use. *Cytotechnology* 2007;53:101-106.
11. Patel DV, Sherwin T, McGhee CN. Laser Scanning In Vivo Confocal Microscopy of the Normal Human Corneoscleral Limbus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47: 2823–2827.
12. Dua HS, Miri A, Said DG. Contemporary limbal stem cell transplantation – a review. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2010; 38: 104–117.
13. Zheng T, Xu J. Age-related changes of human limbus on in vivo confocal microscopy. *Cornea* 2008;27:782-786.
14. Atlas of confocal laser scanning in-vivo microscopy in Ophthalmology. Guthoff RF, Baudouin C, Stave S. Springer. Ch 5; pp 115-130.

Microscopia Confocal na Avaliação de Falência do Limbo Dador após Transplante Autólogo de Limbo e Conjuntiva no Tratamento de Pterigium

Helena Pereira¹; Mário Cruz²; Mariana Almeida³; Maria João Quadrado²; Joaquim Neto Murta⁴

¹Interna Complementar do 4º Ano de Oftalmologia dos HUC

²Assistente Hospitalar de Oftalmologia dos HUC

³Interna Complementar do 3º Ano de Oftalmologia dos HUC

⁴Director do Centro de Responsabilidade Integrada de Oftalmologia dos HUC

1. Centro de Responsabilidade Integrada de Oftalmologia – Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) - EPE

Serviço de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE
Av. Bissaya Barreto - Praceta Prof. Mota Pinto, 3000-075 - COIMBRA
helena_c_pereira@hotmail.com

Trabalho apresentado no 53º Congresso Português de Oftalmologia, 2-4 Dezembro, Vilamoura 2010.

Trabalho não publicado.

Direitos de autor cedidos à Sociedade Portuguesa de Oftalmologia.

Os autores não têm qualquer interesse comercial que interfira com a realização deste estudo.

RESUMO

Introdução: O transplante autólogo de limbo e conjuntiva (CLAU) tem sido utilizado para o tratamento de pterigium primário e recorrente. No entanto o acto cirúrgico poderá constituir uma agressão e, consequentemente, originar uma deficiência de células estaminais na zona dadora.

Objectivo: Avaliar o comportamento do limbo dador, quer clinicamente, quer através de microscopia confocal (MC), nos indivíduos submetidos a CLAU.

Material e Métodos: Análise retrospectiva de 142 olhos (127 doentes), submetidos a CLAU (por pterigium primário ou recorrente) no Serviço de Oftalmologia dos HUC entre 2005 e 2010. A zona dadora foi classificada morfológicamente como: Grau A – ausência de alterações límbicas; Grau B – neovascularização corneana superior a 1mm; Grau C – formação de pseudopterigium. Foi efectuada MC no local da zona dadora em apenas 50 olhos, quarenta dos quais classificados previamente como Grau A, cinco como Grau B e cinco como Grau C.

Resultados: 132 olhos (93%) foram classificados morfológicamente como Grau A; 5 olhos (3,5%) como Grau B e 5 olhos (3,5%) como Grau C. A avaliação da zona dadora com MC demonstrou a existência de: pleomorfismo epitelial e de fibrose sub-epitelial com vascularização superficial localizada, em 100% dos casos; interrupção da membrana basal epitelial em 47 olhos (94%); células dendríticas no epitélio/zona sub-epitelial em 18 olhos (36%); células calciformes na superfície epitelial corneana em 4 olhos (8%) e persistência de palissadas de Vogt na zona dadora em 3 olhos (6%).

Conclusões: O CLAU mostrou ser um procedimento seguro, visto não parecer existir evidência de falência límbica da zona dadora.

Palavras-chave

Pterigium, Autotransplante de limbo e conjuntiva, Insuficiência do limbo dador, Microscopia confocal.

Confocal microscopy in the evaluation of the donor limbal area after conjunctival-limbal autograft for primary and recurrent pterygium

ABSTRACT

Purpose: Conjunctival-Limbal Autograft (CLA) has been successfully used for the treatment of primary and recurrent pterygium. This procedure could lead to stem-cell deficiency in the harvested donor area. Our purpose was to evaluate the limbal donor area, clinically and through confocal microscopy (CA), in patients treated with CLA.

Methods: Retrospective study of 142 eyes (127patients) with primary or recurrent pterygium, that underwent CLA at the Ophthalmology Department of Coimbra University Hospitals between 2005 e 2010. The donor area was morphologically classified as: Grade A – no limbal changes; Grade B – corneal neovascularization above 1mm and Grade C – pseudopterygium formation. CM was performed in the donor limbal area in only 50 eyes, forty of whom previously classified as Grade A; five as Grade B and five as Grade C.

Results: 132 eyes (93%) were morphologically classified as Grade A, 5 eyes (3.5%) as Grade B and 5 eyes (3.5%) as Grade C. The evaluation of the donor limbal area with CM showed the presence of: epithelial pleomorfism and subepithelial fibrosis with localized superficial vascularization in all eyes; basal membrane disruption in 47 eyes (94%); dendritic cells at the epithelium/subepithelial area in 18 eyes (36%); goblet cell crossover in 4 eyes (8%) and Vogt palisades persistence at the donor limbal area in 3 eyes (6%).

Conclusions: CLA appears to be a safe and effective procedure as we have found no firm evidence of limbal failure at the donor harvested area.

Key-words

Pterygium, Conjunctival-limbal autograft, Donor limbus failure, Confocal microscopy.

INTRODUÇÃO

A superfície ocular normal é recoberta pelos epitélios corneano, límbico e conjuntival. Os seus diferentes fenótipos, juntamente com um filme lacrimal estável, mantêm a integridade da superfície.

O pterigium é uma proliferação triangular de tecido proveniente da conjuntiva bulbar, que invade a córnea. Constitui uma patologia comum da superfície ocular, afectando sobretudo populações de regiões tropicais e subtropicais. Existem vários factores que predispoem ao desenvolvimento de pterigium, tais como a radiação ultravioleta, as

alterações do filme lacrimal, o clima seco e o trabalho ao ar livre, entre outros⁵. Nos estadios iniciais, o pterigium pode ser uma lesão apenas com implicações cosméticas, mas, mais tarde, pode causar perda de visão (por attingimento do eixo visual e desenvolvimento de astigmatismo irregular), irritação crónica, inflamação recorrente e restrição dos movimentos oculares⁵.

A excisão cirúrgica é o tratamento de escolha^{7,11,16}. Existem vários procedimentos, classificados como destrutivos e reconstrutivos. A excisão simples é um exemplo de um procedimento destrutivo, mas que cursa com elevada taxa de recidiva. Na tentativa de prevenir a recorrência,

é efectuado normalmente tratamento adjuvante, tal como quimioterapia, irradiação beta ou corticóide. As técnicas reconstrutivas como o transplante de membrana amniótica, o transplante autólogo de conjuntiva - CAU e o transplante autólogo de limbo e conjuntiva - CLAU apresentam taxas de recidiva inferiores^{7,15}.

Diversos trabalhos aconselham a inclusão de tecido límbico (localização das células estaminais corneanas)^{12,16,18} no enxerto conjuntival do CLAU para o tratamento de pterígium primário e recorrente⁸. O objectivo desta cirurgia é o de promover uma transposição de células estaminais de uma zona dadora saudável e protegida, para uma zona receptora deficitária nessas mesmas células⁹.

As células estaminais são células progenitoras, responsáveis pela substituição celular e regeneração tecidual. Caracterizam-se por ser pouco diferenciadas, apresentar ciclos celulares lentos, grande capacidade de expansão clonal e sobrevida longa¹⁸. Apesar de actualmente ainda não existir um marcador que possa identificar uma célula estaminal límbica, existem várias evidências clínicas e científicas [Quadro 1]¹⁸ que suportam o conceito da sua localização ao nível do limbo corneano. Estas células residem num microambiente designado “nicho”, onde encontram as condições necessárias para a sua manutenção. Recentemente, Dua e seus colaboradores, introduziram o conceito de “limbal epithelial crypt”, que parece funcionar como um nicho para as células estaminais corneanas, localizadas nas Palissadas de Vogt¹⁸.

Quadro 1 | Evidências que sugerem localização límbica das células estaminais

Evidência clínica

- ✓ Arquitectura única das palissadas
- ✓ Cicatrização de defeitos epiteliais/úlceras
 - Migração celular centrípeta (a partir do limbo)
 - Migração celular circunferencial (quando envolvimento límbico)
- ✓ Migração de pigmento “em coluna”, a partir do limbo
- ✓ Queratopatia filamentososa
- ✓ Úlceras maiores (mais próximas do limbo) cicatrizam mais rapidamente
- ✓ Deficiência límbica permite conjuntivalização corneana e defeitos epiteliais persistentes

Evidência Científica

- ✓ Morfologia única das células límbicas
- ✓ Índices mitóticos aumentados no limbo
- ✓ Maior potencial proliferativo das células basais límbicas
- ✓ Hemidesmosomas e ausência de “gap-junctions” no epitélio basal límbico
- ✓ Presença de enzimas: enolase-alfa, ABCG2
- ✓ Presença de “Limbal Epithelial Crypts” e Palissadas de Vogt

Foi demonstrado que a exposição crónica a radiação ultravioleta é uma causa de deficiência adquirida e localizada de células estaminais^{8,16}. Tal deficiência manifesta-se, clinicamente, pela perda da normal anatomia límbica, com o aparecimento de “conjuntivalização”, ou seja, invasão da superfície corneana por epitélio conjuntival e vascularização corneana. Estes doentes apresentam frequentemente instabilidade do filme lacrimal, defeitos epiteliais persistentes e queratopatia filamentososa, entre outros³. O diagnóstico de deficiência de células límbicas continua a ser essencialmente clínico. Porém, exames objectivos não invasivos, como a microscopia confocal e a citologia de impressão, são úteis para a confirmação do diagnóstico.

Na literatura, existem vários trabalhos que demonstram a eficácia do CLAU no tratamento do pterígium^{8,9,15,16}, mas muito poucos (ou até nenhum) analisam as alterações que ocorrem na zona dadora^{2,14}. Se entendermos o acto cirúrgico como uma potencial agressão, associado ao facto de o enxerto límbico excisado conter células estaminais, o transplante autólogo de limbo e conjuntiva poderá, teoricamente, predispor a uma deficiência límbica na zona dadora.

Este estudo foi efectuado com o intuito de analisar as alterações que ocorrem na zona de limbo dador, após CLAU, e avaliar se de algum modo tais alterações poderão traduzir falência límbica. À avaliação subjectiva, acrescentámos uma avaliação objectiva com microscopia confocal¹⁴.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi efectuada uma análise retrospectiva da zona dadora de 142 olhos, de 127 doentes, 66 (52%) do sexo masculino e 61 (48%) do sexo feminino, submetidos a CLAU no Serviço de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra – E.P.E. entre 2005 e 2010. A idade média dos doentes à data da cirurgia foi de 64,2 anos (variação de 41-82 anos).

Um total de 102 (71,8%) olhos com pterígium primário e 40 (28,2%) com pterígium recorrente foram tratados com excisão cirúrgica e transplante autólogo de limbo e conjuntiva. Todos os casos apresentavam pterígium progressivo, 96,5% eram pterígium nasal unilateral, distorcendo a área pupilar da córnea em 69,7% dos doentes. Foram excluídos todos os doentes com história prévia de outras patologias oftalmológicas de superfície. O follow-up variou entre 5 e 70 meses.

Todas as cirurgias foram efectuadas sob sedação anestésica. A cabeça do pterígium foi destacada da córnea subjacente com espátula e de acordo com o plano de clivagem. Efectuou-se a remoção extensa do corpo fibrovascular

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Helena Pereira; Mário Cruz; Mariana Almeida; Maria João Quadrado; Joaquim Neto Murta

subconjuntival e a raspagem do tecido fibrótico residual da superfície corneana. O tecido dador foi obtido do olho ipsilateral. O componente límbico do enxerto foi obtido após dissecação a 0,5mm de córnea periférica e apresentava uma amplitude circunferencial semelhante à ressecada no local do pterígio. O enxerto foi aplicado na zona receptora através de cola biológica (Tissucol Duo® 1mg/ml) em 103 olhos (72,5%), ou com sutura dos componentes límbico e conjuntival com Nylon® 10/0 e Vicryl® 8/0, respectivamente, em 39 olhos (27,5%). A zona dadora foi recoberta com conjuntiva em todos os casos, com o recurso a sutura (Vicryl® 8/0) ou a cola biológica. Os cuidados pós-operatórios consistiam na colocação tópica de antibiótico (Ofloxacina, durante 15 dias) e corticóide (Fosfato de Dexametasona, durante 60 dias). Nos casos de CLAU com sutura do enxerto, os pontos eram retirados 2 semanas após a intervenção cirúrgica, sob anestesia tópica.

O tempo médio decorrido entre a cirurgia e a nossa avaliação foi de 34 meses (variação de 5 a 70 meses). As zonas dadora e receptora foram avaliadas por biomicroscopia e fotografadas pelo mesmo observador. As medições foram efectuadas com um compasso oftalmológico (Castroviejo®). Para avaliar a zona dadora, desenvolvemos um Sistema de Caracterização Morfológica: Grau A – sem alterações, englobando cicatrização normal da zona corneana excisada, com neovascularização até 1mm; Grau B – neovascularização superior a 1mm (ultrapassando o limite cirúrgico de excisão do enxerto) e Grau C – pseudopterígio (neovascularização e fibrose ultrapassando o limite cirúrgico de excisão do enxerto). A esta análise clínica, decidimos associar uma análise objectiva. Deste modo, um único observador efectuou Microscopia Confocal (utilizando Heidelberg Retina Tomograph II - Rostock Corneal Module) em 50 olhos (de 50 doentes), quarenta dos quais tinham sido classificados morfológicamente como Grau A, cinco classificados como Grau B e cinco classificados como Grau C.

RESULTADOS

Observou-se a existência de verdadeira recorrência de pterígio [Figura 1a e 1b] em 9 olhos (6,3%), tendo ocorrido ao primeiro mês após a cirurgia em 5 olhos, ao segundo mês em 3 olhos e ao terceiro mês em 1 olho. Em nenhum dos casos de recidiva se observou envolvimento do eixo visual. Ao efectuarmos a avaliação da recorrência, de acordo com o tipo de pterígio [Tabela 1], constatámos que nos casos de pterígio primário a taxa de recidiva era de 3,9% (4 olhos) e, nos casos de pterígio recorrente, de 12,5% (5 olhos).

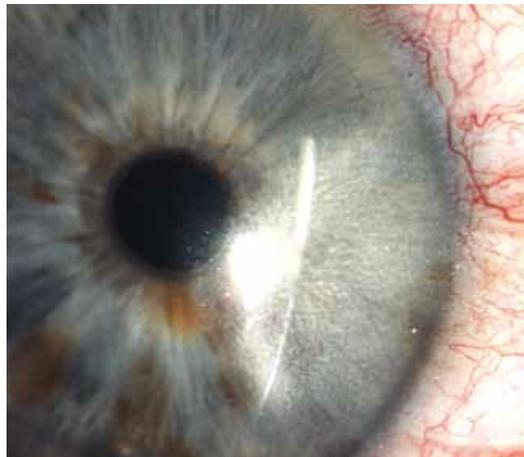


Fig. 1a | Zona receptora sem recidiva.

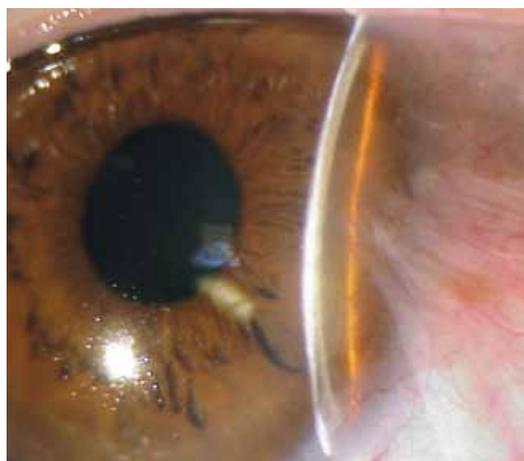


Fig. 1b | Recidiva de pterígio.

Tabela 1 | Avaliação de recidiva de pterígio

	Pterígio Primário	Pterígio Recorrente
Nº de doentes	102	40
Percentagem	71,8%	28,2%
Recidiva (n)	4	5
Taxa de Recidiva (sem atingimento do EV)	3,9%	12,5%

3. ESTUDOS PUBLICADOS

Microscopia Confocal na Avaliação de Falência do Limbo Dador após Transplante Autólogo de Limbo e Conjuntiva no Tratamento de Pterigium

A zona dadora apresentava uma localização temporal superior em 137 olhos (96,5%) e, nasal superior, em 5 olhos (3,5%). Ao efectuarmos uma avaliação morfológica, observámos que em 132 olhos (93%) não existiam alterações da zona dadora (Grau A - [Figura 2a e 2b]); 5 olhos (3,5%) apresentavam neovascularização corneana superior a 1mm (Grau B- [Figura 3]) e 5 olhos (3,5%) tinham desenvolvido pseudopterigium, não ultrapassando contudo os 2mm

subsequentes ao limite cirúrgico de excisão do enxerto (Grau C - [Figura 4]).

A avaliação objectiva da zona dadora foi efectuada com Microscopia Confocal em 50 olhos, de 50 doentes, 25 do sexo masculino e 25 do sexo feminino. Quarenta olhos tinham sido já morfológicamente classificados como Grau A, cinco como Grau B e cinco como Grau C. A idade média dos doentes à data da realização do exame, foi de

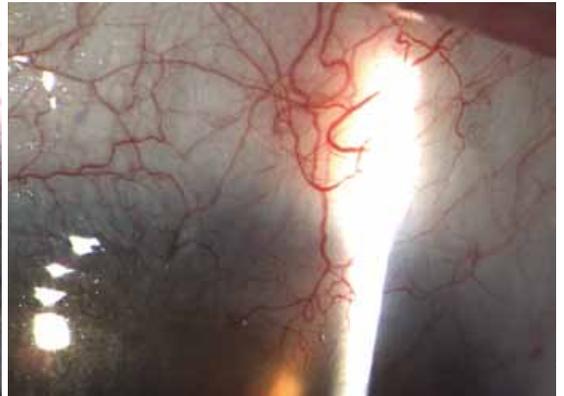
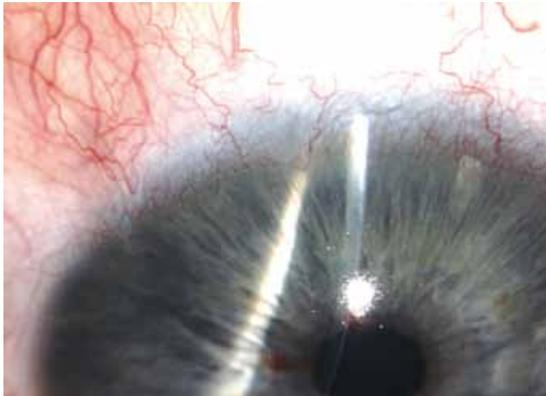


Fig. 2 | Zona dadora sem alterações, englobando o processo normal de cicatrização da zona corneana excisada, com neovascularização até 1mm (Figura 2b) – Grau A.



Fig. 3 | Zona receptora sem recidiva.



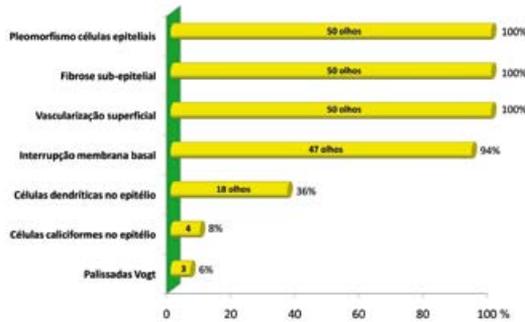
Fig. 4 | Pseudopterigium (neovascularização e fibrose ultrapassando o limite de excisão do enxerto) – Grau C.

66,6 anos (variação de 42 a 84 anos), portanto, com um tempo médio entre a cirurgia e a execução de microscopia confocal de 35,6 meses (variação de 6 a 70 meses). A zona dadora apresentava uma localização temporal superior em

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Helena Pereira; Mário Cruz; Mariana Almeida; Maria João Quadrado; Joaquim Neto Murta

todos os 50 olhos avaliados. As imagens obtidas através da microscopia confocal, revelaram a presença de características peculiares na zona dadora [Gráfico 1]. Em todos os olhos, apesar de uma superfície regular, era evidente a existência de pleomorfismo das células epiteliais, diferente da normal variação apresentada entre os diferentes componentes epiteliais (células superficiais, intermédias ou wing cells e células da camada basal). Não se observavam, porém, sinais de instabilidade ou insuficiência epitelial [Figura 5]. Todos os olhos apresentavam fibrose sub-epitelial [Figura 6]. Associada a esta fibrose, era evidente a presença de vascularização superficial localizada, sempre sub-epitelial [Figuras 7a e 7b]. Constatámos a presença de interrupção da membrana basal epitelial em 94% dos casos (47 olhos) [Figura 8]. Nos restantes 3 olhos (6%), nos quais não existia



Gráf. 1 | Alterações da zona dadora na microscopia confocal.

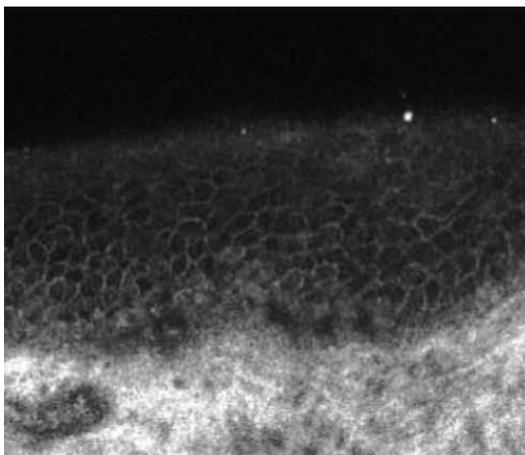


Fig. 5 | Pleomorfismo das células epiteliais.

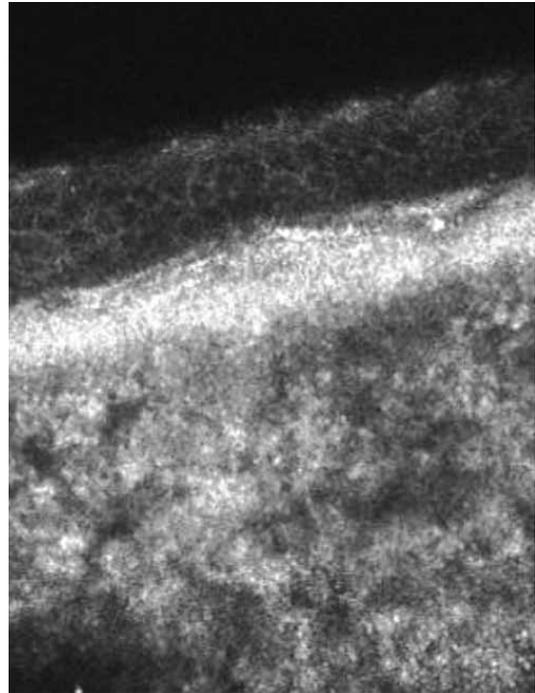


Fig. 6 | Fibrose sub-epitelial.

interrupção da membrana basal, era evidente a persistência das palissadas de Vogt ao nível da zona dadora [Figuras 9a, 9b e 9c]. Outras características foram identificadas com menor frequência, tais como a presença de células dendríticas (ou de Langerhans) ao nível do epitélio ou zona sub-epitelial, em 18 olhos (36%) [Figuras 10a e 10b]. Em 4 olhos (8%) constatámos a existência de células caliciformes (características da superfície conjuntival [Figura 11a]) na superfície corneana [Figura 11b]. Não foi possível efectuar uma correlação entre este achado e a classificação morfológica previamente apresentada, uma vez que, dos quatro olhos que apresentavam esta alteração, dois tinham sido classificados como Grau A (sem alterações ou com neovascularização até 1mm), um como Grau B (neovascularização superior a 1mm) e outro como Grau C (pseudopterigium).

DISCUSSÃO

A cirurgia de pterigium ideal deveria apresentar complicações mínimas, uma taxa de recorrência baixa ou inexistente e ser cosmeticamente aceitável. A simples ressecção do

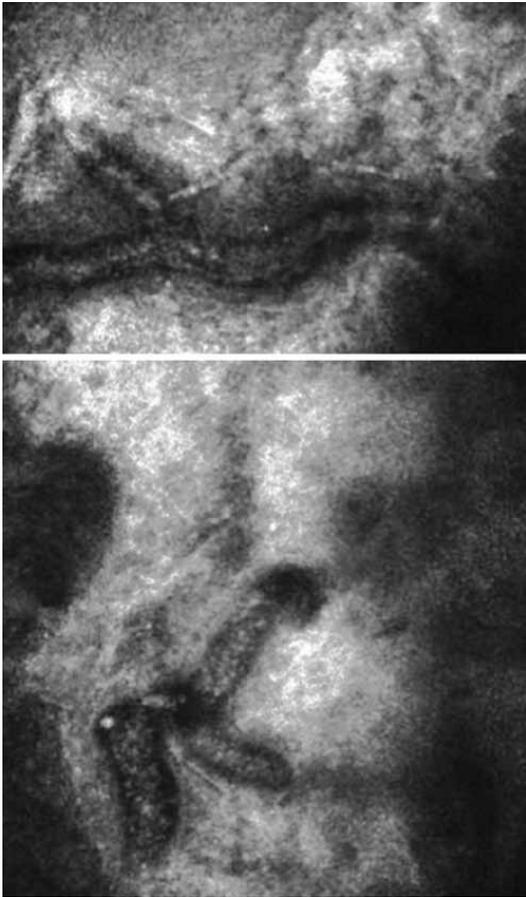


Fig. 7 | Vascularização superficial localizada (sub-epitelial).

pterigium, apresenta uma taxa de recidiva que pode atingir os 89%^{11,18}. A excisão cirúrgica com CLAU associado, constitui uma técnica segura e eficaz para o tratamento de pterigium primário e recorrente. Cursa com uma baixa taxa de recidiva e rápida cicatrização da superfície ocular⁸. O nosso estudo apresentou uma taxa de recidiva global de 6,3%. No entanto, a taxa de recorrência foi significativamente inferior nos casos de pterigium primário (3,9%) comparativamente aos casos de pterigium recorrente (12,5%). A maioria das recidivas tornaram-se evidentes nos primeiros 3 meses, o que se encontra de acordo com os dados existentes na literatura actual.^{1,6,11}

Os trabalhos publicados sobre as alterações da superfície ocular associadas a pterigium, demonstram a existência de metaplasia pavimentosa e aumento da densidade de células calciformes na superfície do mesmo e na conjuntiva

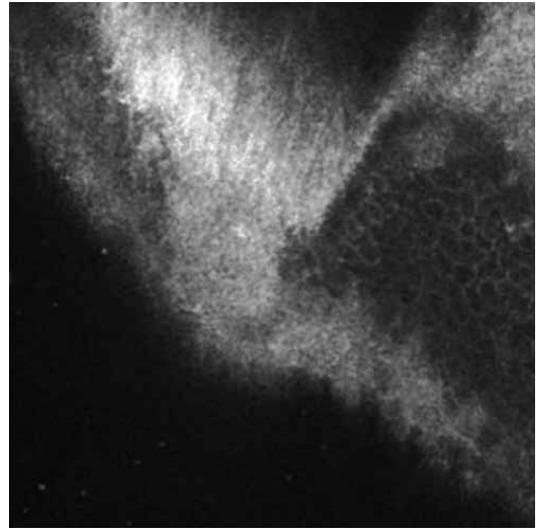


Fig. 8 | Interrupção da membrana basal epitelial.

bulbar inferior³. O conhecimento de que a conjuntiva bulbar superior é normal na maioria dos casos com pterigium (96,7%)³, justificou a nossa selecção desse local como zona dadora preferencial.

Da avaliação clínica da zona dadora, concluímos que a maioria dos olhos (93%) não apresentava qualquer alteração. Os restantes 7%, apresentavam neovascularização ou pseudopterigium ultrapassando o limite cirúrgico de excisão do enxerto, mas nunca excedendo os 2mm (portanto sem qualquer ameaça para o eixo visual). Não se verificou associação entre estas alterações da zona dadora e a ocorrência de recidiva. Estas alterações também não induziram sintomas clínicos que implicassem uma intervenção médica ou cirúrgica adicional. No entanto poderão condicionar uma abordagem cirúrgica futura, nomeadamente na necessidade de se efectuar uma cirurgia filtrante ou de catarata². Alguns estudos defendem que tais alterações são o resultado da técnica cirúrgica usada, constituindo apenas um processo cicatricial normal²: durante o processo de obtenção do enxerto, a remoção concomitante de estroma corneano pode determinar um atraso na reepitelização, permitindo deste modo o crescimento conjuntival na superfície corneana. Os autores que defendem esta teoria², advogam que um modo de tentar minimizar estas alterações passa por efectuar uma dissecação mais superficial do epitélio límbico, poupando desta forma o estroma. Podemos no entanto questionar se ao realizarmos uma dissecação superficial, não estaremos a facilitar a obtenção de um enxerto deficitário em células estaminais.

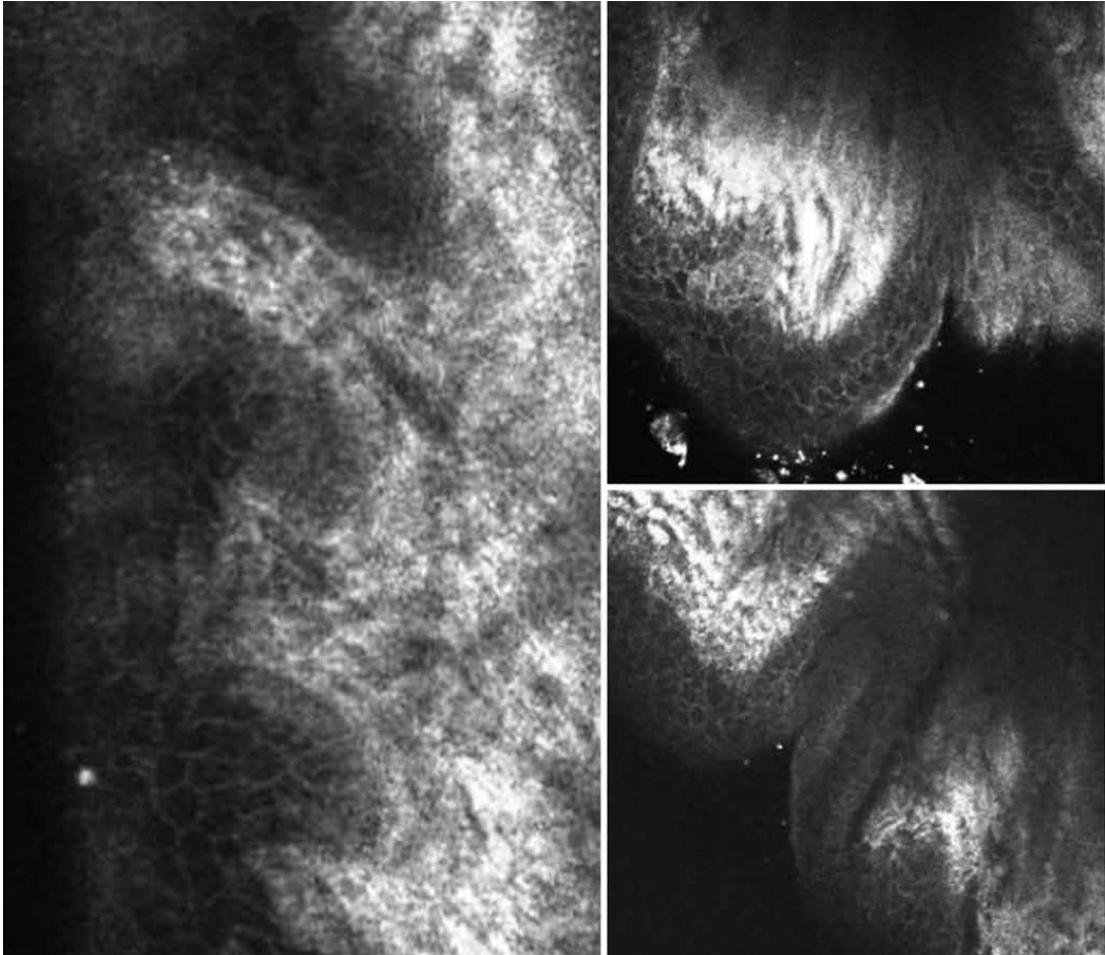


Fig. 9 | Palissadas de Vogt.

Outros estudos referem que o aparecimento de neovasos e o crescimento de pseudopterigium na zona dadora é compatível com falência de células estaminais nesse local^{1,2}. Morfológicamente, a falência límbica caracteriza-se por conjuntivalização e neovascularização associada a crescimento fibroso. Clinicamente estes doentes apresentam história de queratites de repetição, queratite filamentososa e fotofobia persistente (entre outros). Porém, nenhum dos nossos doentes apresentava sinais ou sintomas clínicos compatíveis com deficiência de células límbicas. Dado que o tecido límbico removido da zona dadora é enxertado no olho ipsilateral, alguns autores defendem que o CLAU não enfraquece a função límbica global⁶.

A avaliação objectiva de alguns dos doentes do presente estudo com microscopia confocal veio complementar a informação existente. A maioria dos achados imagiológicos é facilmente compreendida num contexto cicatricial normal: presença de pleomorfismo de células epiteliais, fibrose sub-epitelial e aparecimento de vasos sanguíneos confinados ao estroma superficial, na zona de fibrose. Tais características foram encontradas em 100% das zonas dadoras submetidas a microscopia confocal, independentemente da sua classificação morfológica como Grau A, B ou C. A presença de células dendríticas (ou de Langerhans) no epitélio e região sub-epitelial da zona dadora de 36% dos casos pode também estar associada a um processo inflamatório.

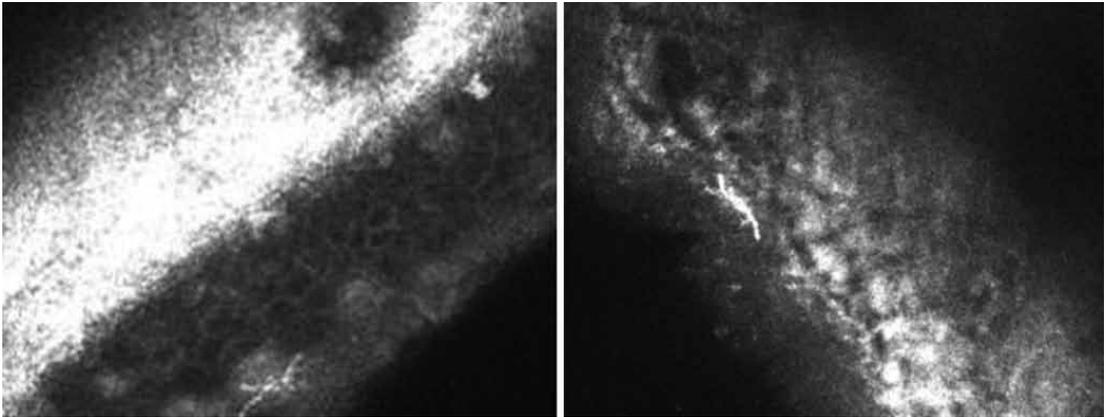


Fig. 10 | Células dendríticas ao nível do epitélio corneano ou zona sub-epitelial.

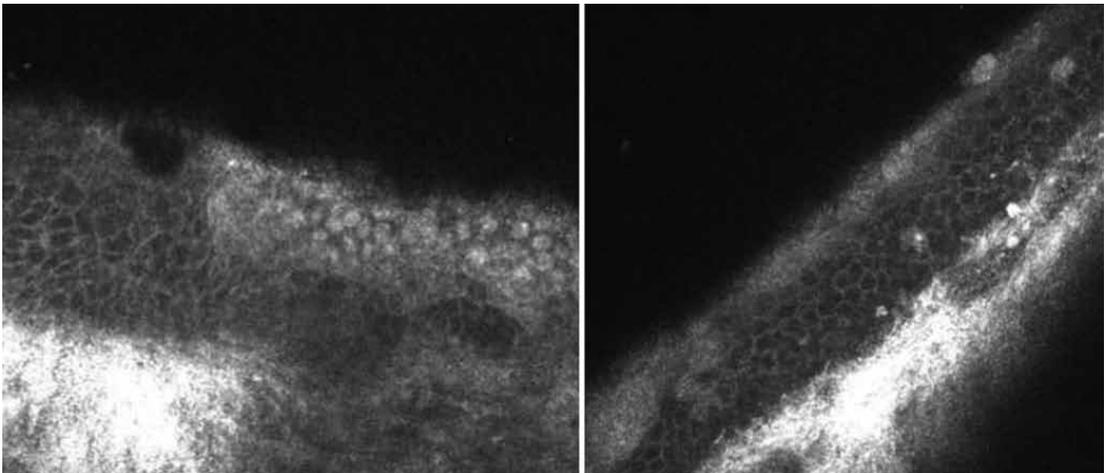


Fig. 11 | a) Zona de transição corneo-conjuntival. b) Células caliciformes na superfície corneana.

No entanto, estas células podem ser encontradas em até 33% dos olhos normais^{13,19}.

O facto de existir interrupção da membrana basal e ausência de palissadas de Vogt na zona dadora em 94% dos casos é justificado pelo princípio da cirurgia, ou seja, a obtenção de um enxerto com a profundidade necessária de modo a conter células estaminais. Nos restantes 6%, era evidente a persistência das palissadas de Vogt. Estes achados são a favor da incapacidade de regeneração destas palissadas, e a sua presença em 3 dos olhos avaliados pode ser explicada por uma dissecação superficial durante o processo de obtenção do enxerto.

A presença de células caliciformes na superfície do epitélio corneano é diagnóstica de insuficiência límbica^{4,10}. Tal característica foi observada em apenas 4 olhos (8%), todos eles sem palissadas de Vogt identificáveis na zona dadora. Porém, mais uma vez, nenhum dos doentes avaliados apresentava sinais ou sintomas clínicos compatíveis com deficiência de células límbicas. Assim, se por um lado, imagiologicamente, a existência de uma única célula caliciforme na superfície corneana é suficiente para efectuar o diagnóstico de insuficiência límbica, por outro, clinicamente, um pequeno número dessas mesmas células parece ser destituído de qualquer significado.

CONCLUSÕES

O transplante autólogo de limbo e conjuntiva constitui uma opção cirúrgica segura e muito eficaz no tratamento cirúrgico do pterígio, aparentemente sem originar deficiência significativa de células estaminais na região de excisão do enxerto e mantendo a função límbica global. Estudos prospectivos mais alargados serão necessários, com um maior número de doentes avaliados por microscopia confocal, ou até combinando esta com diferentes técnicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Al Fayez MF. Limbal versus conjunctival autograft transplantation for advanced and recurrent pterygium. *Ophthalmology* 2002;109:1752-1755.
2. Basti S, Mathur U. Unusual intermediate-term outcome in three cases of limbal autograft transplantation. *Ophthalmology* 1999 May;106(5):958-63.
3. Chan CML, Liu YP, Tan DTH. Ocular surface changes in pterygium. *Cornea* 2002; 21:38-42.
4. Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, Jones RE. Stem cell differentiation and effects of deficiency. *Eye* 2003;17:877-885.
5. Hirst L. Distribution, risk factors, and epidemiology. In: Taylor HR, ed. *Pterygium*, Vol. 2. The Hague, Netherlands: Kugler, 2000, pp. 15-28.
6. Hirst LW, Sebban A, Chant D. Pterygium recurrence time. *Ophthalmology* 1994;101:755-758.
7. Kang DH, See LC, Liaw SB, Tsai RJF. Amniotic membrane graft for primary pterygium comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. *Br J Ophthalmol* 2000;84:973-978.
8. Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96:709-23.
9. Pfister RR. Corneal stem cell disease: Concepts, categorization, and treatment by auto-and homo transplantations of limbal stem cells. *CLAO J* 1994; 20: 64 -72.
10. Puangsrichareon V, Tseng SC; Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-1485.
11. Riordan-Eva P, Keilholm I, Ficker L A. Conjunctival autografting in the surgical management of pterygium. *Eye* 1993; 7: 634-8.
12. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cell. *J cell Biol* 1986; 103: 49-62.
13. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998;82:235-40.
14. Takahashi N, Chikama T, Yanai R, Nishida T. Structures of the corneal limbus detected by laser-scanning confocal biomicroscopy as related to the palisades of Vogt detected by slit-lamp microscopy". *Jpn J Ophthalmol* 2009 May 31;53(3):199-203.
15. Torres J, Fernández I, Quadrado MJ, Murta J, Hererras J, Alió J, et al. Limbal transplantation: multicenter retrospective case series analysis. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2008 Jul;83(7):417-22.
16. Tseng SCG, Chen JJY, Huan AJQ, Kruse FE, Maskin SL, Tsai RJF. Classification of conjunctival surgeries for corneal diseases based on stem cell concept. *Ophthalmol Clinics of North Am* 1990; 3: 595-610.
17. Wong AK, Rao SK, Leung AT, Poon AS, Lam DS. Inferior limbal-conjunctival autograft transplantation for recurrent pterygium. *Indian J Ophthalmol* 2000;48: 21-4.
18. Yeung AM, Schlötzer-Schrehardt U, Kulkarni B, Tint NL, Hopkinson A, Dua HS. Limbal epithelial crypt: a model for corneal epithelial maintenance and novel limbal regional variations. *Arch Ophthalmol* 2008 May;126(5):725-6.
19. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff RF; In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005 Oct;243(10):1056-61.

Evaluation of Treatment With Cysteamine Eyedrops for Cystinosis With Confocal Microscopy

Rui Tavares, MD,* Dalila Coelho, MD,* Maria Carmo Macário, MD,† Alexandra Torres,‡
 Maria João Quadrado, MD,* and Joaquim Murta MD, PhD*

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the efficacy of cysteamine eyedrops 0.1136% (new formulation, now stable at room temperature without the need for refrigeration for up to 2 months) for the treatment of cystine crystals in the cornea using slit lamp biomicroscopy and confocal microscopy.

Methods: A 20-year-old woman with infantile cystinosis, with a history of kidney transplantation at age 10, was studied. She applied cysteamine eyedrops (0.1136%) 10 times a day (a new formulation, now stable at room temperature without the need for refrigeration for up to 2 months, was prepared for compassionate use). The density of the cystine crystals in the cornea was evaluated using slit lamp biomicroscopy and confocal microscopy (Heidelberg Retina Tomograph 2 equipped with the Rostock Module for the Cornea).

Results: The deposits were absent in the surface epithelium and basal cells of the central cornea before and after treatment. We found crystals mainly in the anterior and medium stroma; they had various shapes; were intracellular, rectangular, or fusiform; and showed hyperreflectivity. The posterior stroma showed lower density of the crystals. No deposits in the endothelium were found. Therapy with cysteamine eyedrops reduced the density of the crystals and lessened the photophobia.

Conclusion: Confocal microscopy is a valuable technique to study cystine crystals of the cornea in vivo. Cysteamine eyedrops appear to be very useful in the treatment of these crystals, especially for photophobic complaints.

Key Words: cystinosis, cysteamine eyedrops, confocal microscopy (*Cornea* 2009;28:938–940)

INTRODUCTION

Cystinosis is a rare autosomal-recessive disorder caused by a mutation in the CTNS gene located in the short arm of

chromosome 17 (17p13), which leads to intracellular storage of cystine crystals resulting from a malfunction in its lysosomal transmembrane transporter. It affects 3.5 infants per million births.¹ Its main clinical feature is early and severe renal failure. The thyroid, pancreas, brain, muscle, gonads, and eyes may also be affected. Patients are normal at birth but develop multisystemic diseases at different ages.² Keratopathy resulting from excessive storage of cystine crystals in the cornea is the most common ocular manifestation of the disease. It causes photophobia, blepharospasm, and recurrent corneal erosions. Surprisingly, patients maintain good visual acuity.^{1,3} Crystals are always absent at birth but are invariably present by the first year of age. By age 10 years, most patients develop significant photophobia and blepharospasm.⁴ Cystine crystals can be found in other ocular structures such as the iris, conjunctiva, and retina⁵; crystalline retinopathy usually affects the peripheral retina and may lead to electroretinographical alterations. Cystinosis is diagnosed by the presence of high levels (50- to 100-fold increase) of free cystine in polymorphic nucleated leukocytes or cultivated fibroblasts or by the observation of the crystals in the cornea, which is considered to be pathognomonic.⁶

The mainstay of therapy is a drug called cysteamine, which interacts with free cystine inside the lysosome to form cysteine and the disulfide cysteine-cysteamine; these 2 compounds may then leave the lysosome freely without the need for a membrane transporter.^{2,7} Cysteamine can deplete cells of 90% of its contents of cystine⁸; however, systemic administration has no effect in diminishing cystine corneal crystals.⁹ Thus, topical administration seems an attractive strategy. In fact, cysteamine can be prepared for topical administration and appears to be effective in dissolving the crystals.

Confocal microscopy is a quick, simple, and noninvasive method that allows the study of the histologic structure of the cornea¹⁰ in vivo and in real time. It is possible to achieve images with good quality and high resolution (10 μ m) even in the presence of significant corneal opacities; it is also possible to store images for future comparison.¹¹

MATERIALS AND METHODS

We studied a 20-year-old woman with infantile cystinosis; she had a history of early and severe renal failure, which led to kidney transplantation by age 10 years, growth retardation, intense photophobia, and blepharospasm. She was placed on a regimen of cysteamine eyedrops 10 times a day for 1 year and evaluated at visits at 0, 3, 6, and 12 months. The methods used to assess the efficacy of the treatment were slit

Received for publication June 22, 2008; revision received November 2, 2008; accepted November 22, 2008.

From the *Ophthalmology Department; †Neurology Department; and ‡Pharmaceutical Department, Coimbra University Hospital, Coimbra, Portugal.

The authors state that they have no proprietary interest in the products named in this article.

Reprints: Rui Tavares, MD, Hospital Universidade Coimbra—Departamento de Oftalmologia, Praceta Dr. Mota Pinto, 3004-561 Coimbra, Portugal.

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

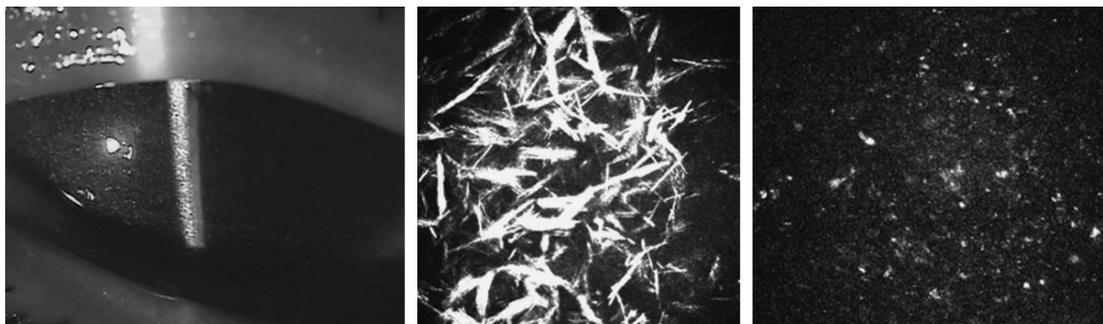


FIGURE 1. Cystine corneal crystals before treatment. Confocal microscopy findings in the anterior stroma (middle photograph) and posterior stroma (right).

lamp biomicroscopy and confocal microscopy (using the Heidelberg Retina Tomograph [HRT II] equipped with the Rostock Module for the Cornea).

The 0.1136% cysteamine eyedrops were prepared in the pharmaceutical department of Coimbra University Hospital for compassionate use after careful informed consent from cysteamine chlorhydrate, EDTA, benzalkonium chloride, and sodium chloride and remained stable without the need of refrigeration for a period of 2 months.¹²

RESULTS

Initial best-corrected visual acuity was 20/30 OU. Biomicroscopy showed crystalline keratopathy, central and peripheral, located in the stroma of both eyes (Fig. 1). Confocal microscopy showed the nature and shape of the crystals: they were hexagonal, needle-shaped, and hyperreflective; they were more plentiful in the anterior stroma than in the posterior stroma, where they were less dense and had rounder shapes (Fig. 1). We found no crystals in either the epithelium or the endothelium.

By the 3- and the 6-month visits, the patient had substantially fewer complaints of photophobia, but no change in best-corrected visual acuity was seen. Confocal microscopy evidenced a decrease in the amount and density of corneal crystals (Fig. 2). The patient reported no adverse side effects and showed great adherence to therapy. By the 12th month of

therapy, the patient presented an improvement in best-corrected visual acuity (20/20 OU) and reported almost no photophobia. However, biomicroscopic and confocal microscopic findings were very similar to those observed in the previous visits (Fig. 3).

DISCUSSION

Topical administration of cysteamine eyedrops led to a great decrease in complaints about photophobia and blepharospasm, even when it began in adulthood. Reviewed papers presented similar results; however, therapy appeared to be more effective the earlier it was started (when begun before age 2, it can actually dissolve corneal crystals completely).⁶

We found a greater decrease in quantity and density of the crystals in the cornea by the third month of therapy; this effect then stabilized until the end of the study. Minimal treatment time to achieve visible benefit appears to be between 3 and 6 months, according to several authors.^{6,13}

Therapy with cysteamine eyedrops was safe and showed no adverse side effects. There was good adherence to therapy, which is probably related to the formulation of eyedrops, which are stable at room temperature for a period of up to 2 months in contrast with other preparations described in the literature, which needed refrigeration between applications and weekly refills.¹⁴ Using this preparation, the patient had a marked improvement in her quality of life.

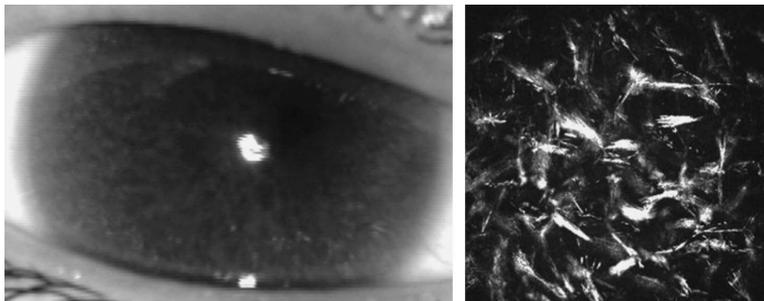
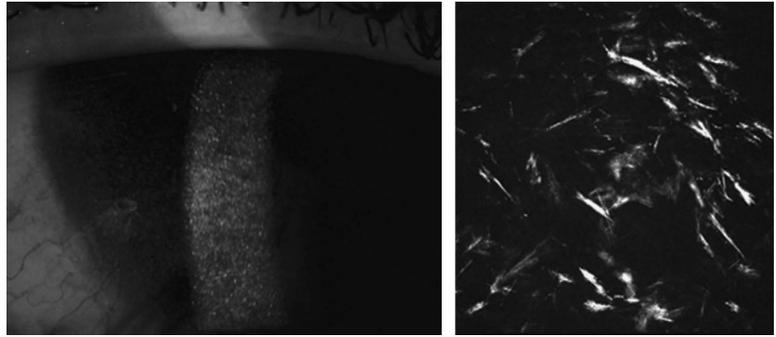


FIGURE 2. Cystine corneal crystals at 3-month follow-up visit (left). Confocal microscopy findings at the 6-month follow-up visit in the anterior stroma (right).

FIGURE 3. Cystine corneal crystals at 12-month follow-up visit. Confocal microscopy findings in the anterior stroma (right). The patient reports much less photophobia and blepharospasm. It is visible the lower density of the crystals.



Confocal microscopy appears to be a useful tool to demonstrate the presence, nature, and localization of cystine corneal crystals. It can also be used efficaciously to evaluate the effectiveness of therapy.

REFERENCES

1. Sutphin JE. *Basic and Clinical Science Course, Section 8, 2005–2006, External Disease and Cornea*, San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2004.
2. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, vol III. New York: McGraw Hill; 2001:5085–5108.
3. Victor G, Campos PJG, Alves MR, et al. Microscopia confocal in vivo na cistinose—Relato de caso. *Arq Brás Oftalmol*. 2004;67:553–557.
4. Iwata F, Kuel EM, Reed GF, et al. A randomized clinical trial of topical cysteamine disulfide (cystamine) versus free thiol (cysteamine) in the treatment of corneal cystine crystals in cystinosis. *Mol Genet Metab*. 2000;71:100–120.
5. Tsilou ET, Rubin BL, Reed GF, et al. Age-related prevalence of anterior segment complications in patients with infantile nephropathic cystinosis. *Cornea*. 2002;21:173–176.
6. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, vol III. New York: McGraw Hill; 2001:5094–5097.
7. Pisoni RL, Thoene JG, Christensen HN. Detection and characterization of carrier-mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. *J Biol Chem*. 1985;260:4791.
8. Gahl WA, Kuehl EM, Iwata F, et al. Corneal crystals in nephropathic cystinosis: natural history and treatment with cysteamine eyedrops. *Mol Genet Metab*. 2000;71:100–120.
9. Tsilou ET, Thompson D, Lindblad AS, et al. A multicentre randomised double masked clinical trial of a new formulation of topical cysteamine for the treatment of corneal cystine crystals in cystinosis. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:28–31.
10. De Nicola R, Labbé A, Amar N, et al. Microscopie confocale et pathologies de la surface oculaire: corrélations anatomo-cliniques. *J Fr Ophthalmol*. 2005;28:691–698.
11. Leduc C, Dupas B, Ott-Benoist AC, et al. Intérêt du microscope confocal cornéen in vivo HRT2 pour l'étude de l'épithélium cornéo-conjonctival. *J Fr Ophthalmol*. 2004;27:978–986.
12. Ficher-Tartaglia D, Kahni-Simonius J. Gotas oftálmicas de cloridrato de cisteamina—elaboração, análise e estabilidade. *Kranzenhauspharmazie*. 1994;15:10.
13. Kaiser-Kupfer MI, Fujikawa L, Kuwabara T, et al. Removal of corneal crystals by topical cysteamine in nephropathic cystinosis. *N Engl J Med*. 1987;316:775–779.
14. Kahn AO, Latimer B. Successful use of topical cysteamine formulated from the oral preparation in a child with keratopathy secondary to cystinosis. *Am J Ophthalmol*. 2004;138:674–675.

4. DISCUSSÃO

Os estudos que apresentámos na secção anterior procuraram responder às questões que tínhamos colocado como objectivos do nosso plano de investigação: saber se a MCC pode quantificar estruturas celulares das diferentes camadas da córnea e se pode ser utilizada para observar em tempo real, estruturas corneanas com detalhe histológico. Na nossa opinião, os estudos que realizámos permitem responder afirmativamente a ambas as questões, conforme procuraremos mostrar neste capítulo.

Medição de densidades celulares em córneas normais

Com a consolidação da utilização clínica da MCC para observação qualitativa e diagnóstico de várias patologias corneanas, cedo se considerou que a medição de densidade de células em diferentes camadas da córnea e a comparação de tais densidades com os valores reportados por histologia era essencial para o estabelecimento da MCC como técnica de avaliação *in vivo* da microestrutura da córnea.

A utilização da MCC para a determinação *in vivo* de densidades celulares na córnea incidiu inicialmente sobre os queratócitos no estroma. Contudo, essas medidas foram apresentadas como densidades superficiais (Prydal, 1998). A utilização de densidades volumétricas assumia uma distribuição uniforme dos queratócitos na córnea (Stave, 1998) e as técnicas de estereologia não eram empregues no seu cálculo. A repetibilidade das medidas também não foi avaliada. Mustonen (Mustonen, 1998a) estendeu a medição das densidades celulares para as camadas epitelial e endotelial e validou as medições nesta última camada, por comparação com a microscopia especular (Mustonen, 1998b). Só mais tarde surgiu a utilização de técnicas de estereologia para determinar densidades volumétricas de queratócitos, bem como a validação dos resultados por medidas em exames histológicos, primeiro em coelhos (Patel, 1999) e depois em córneas humanas (Patel, 2001).

Este era o estado da arte quando iniciámos os nossos estudos sobre a avaliação quantitativa da microestrutura da córnea por MCC. Logo em 2001, adaptamos a

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

metodologia de Patel para utilização em microscópios confocais da córnea do tipo de varrimento de fenda, tendo os nossos estudos sido apresentados em conferência (Quadrado, 2002; Popper, 2003) antes da sua publicação final em revista (Popper, 2004). Um outro estudo publicado em 2002 (Berlau, 2002) apresenta igualmente medições de densidades volumétricas de queratócitos, usando um microscópio confocal de varrimento de fenda. Neste trabalho não é claro se as técnicas estereológicas foram empregues na determinação das densidades volumétricas. Os autores utilizaram, para a secção axial óptica, o valor de 10 μm , fornecido pelo fabricante do microscópio confocal empregue. Os resultados apresentados não foram validados por outra técnica.

A determinação das densidades volumétricas de queratócitos baseia-se na contagem destas células em imagens de MCC, utilizando uma moldura de contagem não enviesada (Gundersen, 1988; Gundersen, 1977) seguida do cálculo da densidade volumétrica por métodos estereológicos, usando o factor de correcção de Abercrombie (Abercrombie, 1946), conforme descrito no nosso artigo (Popper, 2004). O cálculo deste factor de correcção e, conseqüentemente, a determinação das densidades volumétricas exigiu a medição experimental da espessura da secção óptica axial do microscópio confocal da córnea e do comprimento dos queratócitos na direcção perpendicular ao plano de contagem (direcção axial).

A secção óptica axial do microscópio confocal da córnea corresponde ao valor da largura a meia altura da resposta a impulsos do sistema óptico (PSF – *Point Spread Function*), medida no plano axial, e constitui uma medida da sua resolução axial. Equivale à espessura axial associada a cada imagem registada pelo microscópio. O valor especificado pelo fabricante do microscópio confocal que utilizámos (Confoscan P4, Tomey, Fortune Technologies, Vigonza, Itália), para a profundidade do volume de observação é 10 μm . De forma a verificar a validade desta indicação, determinámos experimentalmente a resposta a impulsos do microscópio confocal. Para tal, utilizámos um espelho plano Melles-Griot, modelo 01 MFG 011 (planura $\lambda/4$), instalado num posicionador de precisão Melles-Griot MicroBlock™ 17 AMB 003, que permite movimentos segundo os três eixos, com uma resolução de 1 μm . Mantivemos

o microscópio fixo, focado num determinado plano e varremos o espelho através desse plano focal, em incrementos de posição de 1 μm . Obtivemos uma curva de irradiância que equivale à PSF axial do microscópio confocal e de onde se retirou o valor de largura a meia altura de 8 μm .

O tamanho dos queratócitos na direcção axial foi obtido a partir de medições realizadas em imagens obtidas por microscopia óptica em cortes histológicos do estroma corneano.

Nos trabalhos de Patel (Patel, 1999; Patel, 2001), as densidades volumétricas dos queratócitos obtidas *in vivo* por MCC, foram comparadas com valores obtidos por histologia. As densidades volumétricas foram determinadas histologicamente com um conjunto de cortes realizados ao longo do estroma, utilizando o método de cálculo já descrito, sendo que aqui, a secção óptica corresponde directamente à espessura do corte histológico. Os limites de concordância entre as duas técnicas foram calculados pelo método de Bland e Altman (Bland, 1986). Nos nossos trabalhos (Quadrado, 2003), utilizámos uma metodologia idêntica para comparar as densidades volumétricas de queratócitos por MCC de varrimento de fenda e por histologia. Comparámos ainda medidas de densidades superficiais de células epiteliais superficiais, epiteliais basais e endoteliais, alargando, deste modo, o âmbito dos estudos realizado por Patel. Também aqui os limites de concordância foram calculados pelo método de Bland e Altman. Ficou assim provado que é possível medir *in vivo*, com exactidão, a densidade volumétrica de queratócitos e as densidades superficiais das células epiteliais superficiais e basais e das células endoteliais com um microscópio confocal da córnea do tipo de varrimento de fenda. A prova da exactidão da microscopia confocal de varrimento de fenda, feita por validação por histologia, foi pioneira e clinicamente relevante. O arranjo óptico destes microscópios, em que uma fenda estreita é varrida sobre o plano focal da amostra, quer no trajecto de iluminação, quer no trajecto de detecção da luz, implica que estes microscópios só são verdadeiramente confocais na direcção perpendicular ao eixo maior da fenda. Assim, as propriedades de seccionamento óptico diferem entre as direcções vertical e horizontal, facto que poderia afectar as medições de densidades de volumétricas de

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

células. No nosso estudo (Popper, 2004) comparámos os resultados obtidos em imagens de MCC de botões corneanos de cadáver, com as imagens histológicas dos mesmos botões que entretanto haviam sido corados com hematoxilina-eosina. Verificámos a correspondência das densidades celulares calculadas nas 6 camadas corneanas, entre as imagens de MCC e as imagens histológicas. Este estudo foi pioneiro porque realizado em tecidos humanos e com recurso às técnicas de estereologia para a quantificação das densidades celulares. Na realidade, os estudos então publicados eram poucos e a grande maioria efectuados em animais (Jester, 1992; Petroll, 1996; Patel, 2001; Ku, 2002; Jalbert, 2003). O nosso estudo permitiu, assim, dissipar as dúvidas relativas à utilização dos microscópios de varrimento de fenda para quantificação de densidades celulares na córnea. Um estudo posterior (McLaren, 2005) veio confirmar que as medidas de densidade volumétricas de queratócitos obtidas por um microscópio *tandem scanning* e um microscópio de varrimento de fenda não apresentavam diferenças estatisticamente significativas.

Apesar de exigir uma avaliação rigorosa das características ópticas do microscópio confocal, o método que utilizámos para calcular as densidades volumétricas dos queratócitos é um método suficientemente simples para ser utilizado na prática clínica. A secção óptica do microscópio pode ser medida pelo fabricante e manter-se-á inalterada durante a utilização do instrumento. O algoritmo de cálculo das densidades volumétricas é extremamente simples e facilmente pode ser incorporado no *software* de utilização do microscópio.

Um aspecto fundamental para o estabelecimento da MCC como técnica capaz de quantificar *in vivo* a microestrutura celular da córnea é avaliação da precisão da técnica, através da determinação das repetibilidades intra-sessão e inter-sessão. Em 1999, Patel avaliou a repetibilidade do seu método de medição de densidades volumétricas de queratócitos, para medidas repetidas realizadas na mesma sessão (Patel SV, 1999). Os autores reportaram coeficientes de variação (correspondentes à razão entre o desvio padrão das medidas repetidas e o valor médio dessas medidas), para as córneas de coelhos, que variam entre 0.032 e 0.075. Estes valores traduzem a precisão das medições de densidades volumétricas de queratócitos dentro da mesma

sessão de medição.

As repetibilidades intra-observador e inter-observador, na medição da densidade superficial das células endoteliais, por MCC, foram reportadas por Imre (Imre, 2001). As medidas foram todas realizadas na mesma sessão e confirmaram a elevada repetibilidade que era expectável face à fácil visualização da camada endotelial, nos microscópios de varrimentos de fenda, e à morfologia característica das células endoteliais. Tanto quanto sabemos, o nosso estudo (Popper, 2004) foi o primeiro a apresentar valores de repetibilidade intra-sessão e inter-sessão na determinação de densidades celulares, por MCC, para todas as camadas da córnea. A repetibilidade intra-sessão foi avaliada repetindo medições realizadas, numa única córnea, utilizando imagens diferentes obtidas na mesma sessão. A repetibilidade inter-sessão foi calculada com base em medições repetidas da mesma córnea, realizadas em duas sessões distintas com um intervalo de catorze dias. Utilizamos uma definição normalizada de repetibilidade, recorrendo às definições de repetibilidade especificadas pelas normas de metrologia, como a British Standards Institution (British Standards Institution: London, BSI, 1975). Estas repetibilidades correspondem à máxima diferença expectável, com um nível de confiança de 95%, entre medições. Durante a preparação deste documento analisámos de novo os dados recolhidos para a determinação das repetibilidades intra- e inter-sessão, expressando agora os valores em unidades de densidade celular. As melhores repetibilidades, em termos de percentagem do valor médio da correspondente densidade celular, foram obtidas para a camada endotelial (intra-sessão: 31.8 cél/mm²; inter-sessão: 57.6 cél/mm²) o que é explicado pelo padrão regular característico que diminui em muito a incerteza na contagem de células. As camadas estromais apresentam as piores repetibilidades, sendo os valores similares entre as 3 camadas. Os valores médios obtidos para o estroma são 2 . cél/mm³, para a repetibilidade intra-sessão, e 2 . cél/mm³, para a repetibilidade inter-sessão. As repetibilidades observadas nas camadas epitelial superficial (intra-sessão: 79.7 cél/mm²; inter-sessão: 72.7 cél/mm²) e epitelial basal (intra-sessão: 401.7 cél/mm²; inter-sessão: 312.7 cél/mm²) ficam claramente abaixo de variações de 10% do respectivo valor médio de densidade celular.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Ao sermos pioneiros na determinação da repetibilidade da determinação de densidades celulares para todas as camadas da córnea, contribuímos significativamente para o estabelecimento da MCC como técnica quantitativa de avaliação clínica da córnea. Os valores de repetibilidade que obtivemos permitiram estabelecer definitivamente a viabilidade da MCC no seguimento de doentes. Confirmámos assim a sua importância, quer em termos de avaliação clínica, quer em termos de avaliação da eficácia das terapêuticas instituídas, quer ainda a sua utilidade na realização de estudos longitudinais. As repetibilidades permitem igualmente provar a utilidade da MCC no diagnóstico clínico baseado na quantificação de microestruturas corneanas.

A possibilidade de realizar estudos longitudinais com base em medições quantitativas por MCC foi rapidamente reconhecida por outros investigadores que suportaram a validade dos seus estudos nos valores de repetibilidade que nós reportámos (Efron, 2007; Efron, 2009; Mendrinos, 2009; Efron, 2010; Nieto-Bona, 2010; Nieto-Bona, 2011).

É de grande importância referir, que o conjunto de valores considerados hoje em dia como valores de referência para as densidades celulares de indivíduos normais, em cada uma das camadas corneanas, corresponde aos resultados obtidos por um pequeno conjunto de estudos quantitativos, efectuados com uma metodologia rigorosa, no início deste século (Patel SV, 2001; McLaren, 2005). Este conjunto restrito, que inclui o estudo por nós efectuado (Popper, 2004), é regularmente citado, nomeadamente sempre que se pretende avaliar densidades celulares em córneas com patologia.

Um aspecto que foi polémico relativamente à arquitetura da córnea normal é o perfil de variação na distribuição da densidade dos queratócitos ao longo do estroma. O nosso estudo mostrou um decréscimo de densidade do estroma anterior (28616 células/mm³) para o estroma médio (19578 células /mm³), seguido de um aumento significativo na densidade de queratócitos no estroma posterior (26073 células /mm³). Este perfil de variação é similar ao reportado Berlau (Berlau, 2002). Contudo, alguns estudos reportam um perfil de decréscimo constante do estroma anterior para o

posterior (Erie, 1999; Erie, 2002; Erie, 2003B), ou apenas um ligeiro aumento, embora estatisticamente não significativo, na densidade de queratócitos do estroma médio para o posterior (Patel SV, 2001; Patel SV, 2002; McLaren, 2010). O mesmo resultado foi obtido por Tomografia de Coerência Óptica (OCT) (Karimi, 2011).

Os estudos de Patel, McLaren e Erie, todos eles realizados no mesmo grupo de investigação - Prof. William M. Bourne, Mayo Clinic, Rochester, EUA - utilizando um microscópio confocal do tipo *tandem scanning*, correspondem às observações de decréscimo contínuo da densidade de queratócitos com a profundidade do estroma. O microscópio *tandem scanning* possuía uma lente interna móvel que permitia controlar e conhecer com exactidão a profundidade da secção óptica da córnea examinada. Esta característica permitiu aos autores uma definição quantitativa das camadas do estroma (estroma anterior: 0 a 10% da espessura do estroma; estroma médio: 34-66%; estroma posterior 91 a 100%), com todas elas a incluírem múltiplas imagens a diferentes profundidades.

Quer o nosso estudo, quer o estudo de Berlau, foram realizados com um microscópio confocal de varrimento de fenda. Estes microscópios não possuem um mecanismo equivalente ao existente nos microscópios *tandem scanning* para determinação da profundidade examinada, o que levou à definição do estroma anterior como a primeira imagem após a camada de Bowman e do estroma posterior como a imagem imediatamente anterior à membrana de Descemet. Assim sendo, foi utilizada, quer por nós, quer por Berlau, uma definição de estroma anterior e posterior com uma localização precisa, sempre adjacente à camada de Bowman e à membrana de Descemet, definição que resulta em espessuras inferiores às utilizadas pelos outros autores.

Ora, existem várias evidências que apontam para picos na densidade de queratócitos exactamente nas regiões adjacentes à camada de Bowman e à membrana de Descemet. Berlau documenta estes picos ao apresentar medidas para três imagens em profundidades sucessivas, com espessuras de 30 μm , imediatamente após a camada de Bowman (24 320; 11 980; 11 510 células/ mm^3) e imediatamente antes da membrana de Descemet (13 590; 14 670; 18 850 células/ mm^3) (Berlau,

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

2002). Patel também mediu a densidade de queratócitos na imagem mais anterior do estroma, obtendo um valor claramente superior ao que observou para a sua definição de estroma anterior (33 050 vs 28 838 cél/mm³). Assim, somos de opinião que a diferença entre os perfis de variação de densidade de queratócitos pode resultar apenas da média das densidades observáveis no conjunto de imagens que constituem a camada estroma posterior na definição utilizada nos trabalhos publicados pelo grupo do Prof. Bourne (Erie, 1999; Erie, 2002; Erie, 2003B, Patel SV, 2001; Patel SV, 2002; McLaren, 2010).

O que não oferece qualquer dúvida é que a densidade de queratócitos no estroma anterior é sempre superior à observada nas restantes camadas. É sugerido que tal constitui uma forma de protecção contra a extensão posterior das infecções do epitélio corneano (Wilson, 2001).

Uma possível explicação a para menor densidade de queratócitos no estroma médio pode ser a menor disponibilidade de oxigénio no estroma médio, quando comparado com os estromas anterior e posterior, devido à limitação fisiológica da difusão de oxigénio a partir da região epitelial e do humor aquoso. Estas diferenças na concentração de oxigénio podem ainda ser responsáveis pelas diferenças de morfologia entre os queratócitos do estroma (Hahnel, 2005; Muller, 1995).

Densidades celulares em córneas diabéticas

Estabelecida uma metodologia de quantificação de densidades celulares em todas as camadas da córnea e demonstrada a sua validade por comparação com histologia bem como a sua repetibilidade intra- e intersessão, procurámos aplicá-la a condições clínicas. A córnea diabética surgiu naturalmente como alvo de aplicação da nossa metodologia. Desde os trabalhos pioneiros de Cunha-Vaz (Cunha-Vaz, 1966a; Cunha-Vaz, 1966b; Cunha-Vaz, 1966c; Shakib, 1966; Faria de Abreu, 1975), relativos às barreiras hemato-retinianas e suas alterações na diabetes, que foi dado particular ênfase a esta patologia, quer relativamente ao seu estudo, quer ao seu tratamento. Tal contribuiu para que um elevado número de doentes diabéticos procurassem as nossas consultas. Por isto, e associado ao actual aumento da prevalência da diabetes,

a queratopatia diabética é uma complicação frequente na minha prática clínica.

A diabetes é uma doença que influencia substancialmente a córnea. As alterações corneanas secundárias à diabetes, genericamente designadas por queratopatia diabética, ocorrem em todas as camadas e manifestam-se clinicamente por queratite puncteada superficial, erosões epiteliais e defeitos epiteliais persistentes (Schultz, 1981). Observa-se igualmente um risco acrescido de infecções microbianas. Antes destas manifestações clínicas ocorrem anomalias subclínicas que incluem alterações da barreira epitelial (Gekka, 2004; Gobbels, 1989; Yokoi, 1997), espessamento da membrana basal (Azar, 1989; Azar, 1992), anomalias morfológicas das células epiteliais e endoteliais (Matsuda, 1987; Meyer, 1988; Datiles, 1990; Tsubota, 1993; Ohguro, 1995; Hosotani, 1995) e alterações do plexo nervoso sub-basal (Rosenberg, 2000; Malik, 2003; Kallinikos, 2004; Popper, 2005). Estas anomalias sub-clínicas foram investigadas *in vitro*. Se exceptuarmos a medição da permeabilidade epitelial por fluorometria de fluoresceína, antes do advento da MCC a observação clínica *in vivo* havia sido relatada apenas para as alterações endoteliais. A fronteira entre as ocorrências clínicas e subclínicas era determinada pelo poder de resolução do exame biomicroscópico e do exame especular.

A MCC veio permitir a observação directa das células em todas as camadas corneanas, abrindo o caminho ao estudo *in vivo* das alterações celulares associadas à queratopatia diabética. Para além dos estudos do plexo nervoso sub-basal, discutidos mais adiante, a MCC começou a ser empregue para observações qualitativas da microestrutura celular da córnea diabética (Rosenberg, 2000). Quando iniciámos os nossos estudos relativos às densidades celulares da córnea diabética existia apenas um trabalho publicado contendo medidas de tais densidades (Frueh, 1995). Este estudo incidia sobre as células basais epiteliais, os queratócitos do estroma anterior e as células endoteliais e não encontrou quaisquer diferenças relativamente às córneas normais. Salienta-se que os métodos empregues não aplicavam as técnicas de estereologia para determinação das densidades de queratócitos. Mais ainda, as densidades de células epiteliais basais, medidas em córneas saudáveis são cerca de 3.5 vezes inferiores aos valores medidos no nosso estudo de 2004 (Popper, 2004) e aos

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

valores reportados por diversos autores (Mustonen, 1998; Harrison, 2003; Vanathi, 2003).

Do que dissemos, fica evidente que existia o interesse e justificava-se o estudo quantitativo, por técnicas validadas, das densidades celulares da córnea diabética. Utilizando a metodologia que desenvolvemos (Popper, 2004), planeámos um estudo comparativo das densidades celulares de diferentes camadas da córnea entre diabéticos e controlos saudáveis. Restringimos a nossa análise à camada superficial do epitélio, fundamental na protecção corneana contra agentes externos, à camada basal do epitélio importante para a renovação contínua do epitélio e à camada endotelial responsável por manter a transparência do estroma, regulando a hidratação da córnea. Analisámos ainda o estroma anterior, imediatamente a seguir à membrana de Bowman, o estroma posterior na região junto à membrana de Descemet e o estroma médio, numa localização equidistante entre a membrana de Bowman e a membrana de Descemet. Estas localizações reproduzem as que utilizámos ao estabelecer a metodologia e que demonstrámos serem reprodutíveis (Popper, 2004). Procurámos verificar a ocorrência de alterações morfológicas nas fases precoces da diabetes, tendo, para tal, restringindo as observações a doentes diabéticos apresentando um nível 20 de retinopatia diabética (só microaneurismas; sem outras características) de acordo com a classificação ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy) (ETDRS, 1991). Face à clínica associada à queratopatia diabética, esperávamos encontrar alterações morfológicas principalmente a nível da superfície ocular.

De facto, o nosso estudo mostrou que, nos diabéticos, a densidade de células basais epiteliais é significativamente inferior à observada nos indivíduos saudáveis (15%; $p = 0.0004$), um resultado que pode explicar a diminuição da capacidade de cicatrização epitelial, característica nestes doentes. Algum tempo depois, um estudo publicado por Chang (Chang, 2006) produziu um resultado semelhante em diabéticos com retinopatia não proliferativa: diminuição de 5% da densidade de células basais epiteliais. Estes foram os primeiros estudos a demonstrar esta diminuição.

O estudo que realizámos não permite identificar o mecanismo responsável pela diminuição da densidade das células epiteliais basais. Ainda hoje mantemos a opinião

de que esta diminuição resulta da acção conjunta de vários mecanismos. Um destes mecanismos é alteração da inervação corneana. Desde longa data que, na observação clínica dos doentes, é óbvia uma estreita ligação entre defeitos epiteliais persistentes/úlceras neurotróficas e a diminuição da sensibilidade corneana. Nos doentes diabéticos, o advento da MCC permitiu demonstrar quantitativamente a diminuição da inervação sub-basal da córnea (Rosenberg, 2000; You, 2000; Malik, 2003; Popper, 2005; Quattrini, 2007; Nitoda, 2012; Ahmed, 2012). Esta diminuição, que ocorre logo nas fases precoces da doença, conforme demonstrou o nosso estudo realizado com doentes diabéticos com retinopatia grau 20 ETDRS (Popper, 2005), pode estar na origem da depleção das células basais uma vez que o metabolismo corneano depende de uma adequada inervação. De facto, os nervos sensitivos da córnea fornecem neuropeptídeos tróficos, tais como a substância P, a acetilcolina, a CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*) e o NGF (*Nerve Growth Factor*). Apesar da função básica destes factores neurotróficos ser o desenvolvimento, manutenção e sobrevivência de células de origem neuronal, várias evidências mostram que estes factores influenciam as células epiteliais da córnea. Estudos *in vitro* (Garcia-Hirschfeld, 1994; Reid 1993; You, 2000) mostram que os factores neurotróficos aumentam a proliferação destas células epiteliais e afectam a sua diferenciação, tendo um impacto directo na integridade da superfície ocular, uma vez que esta depende do equilíbrio entre proliferação e diferenciação. Ficou demonstrado que o NGF estimula a proliferação epitelial da córnea e induz a diferenciação das células epiteliais (You, 2000; Hong, 2012) razão pela qual se tornou o primeiro factor de crescimento com eficácia provada no tratamento das úlceras neurotróficas da córnea (Aloea, 2008). A utilização de factores neurotróficos no tratamento destas úlceras é uma área de investigação clínica bastante activa e promissora, com vários estudos de Fase III a decorrer, onde estamos bastante envolvidos.

O que acima escrevemos, permite-nos colocar a hipótese de que a diminuição da expressão de factores neurotróficos na córnea diabética, consequência de uma menor inervação, pode contribuir para diminuição da densidade de células epiteliais basais, que observámos.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

As disfunções metabólicas associadas à diabetes interferem na adesão das células epiteliais basais à membrana basal, afectando a migração destas células. Este mecanismo pode também contribuir para a menor densidade de células epiteliais basais nos diabéticos. Estudos por microscopia electrónica realizados em córneas diabéticas de ratos (Kim, 2010) e humanas (Azar, 1992; Meller, 1996; Tabatabay, 1988) mostraram que a área da membrana basal ocupada por hemidesmossomas se encontra reduzida quando comparada com córneas normais, sugerindo alterações na interacção entre as células e a matriz extracelular (Azar, 1992). Estudos *in vitro* realizados em córneas de dadores, permitiram verificar uma redução significativa da adesão das células epiteliais às proteínas da matriz extracelular, devido à glicação não-enzimática do colagénio tipo I e da fibronectina (McDermott, 2003). Verificam-se também, na córnea de diabéticos com retinopatia, alterações na composição da membrana basal e da matriz extra-celular, nomeadamente a redução das componentes envolvidas nos complexos de adesão tais como o nidogénio-1/entactina, laminina-1, laminina-10 e a integrina epitelial $\alpha 3\beta 1$ (VLA-3) e o aumento da expressão da metaloproteinase da matriz (MMP)-10 (Ljubimov, 1998; Saghizadeh, 2001; Kabosova, 2003). A sobre-expressão da MMP-10 pode estar na origem das alterações observadas nas componentes da membrana basal acima referidas através do aumento da degradação proteolítica.

Existem ainda estudos que mostram que a acumulação de produtos avançados de glicação na membrana basal, em particular na laminina, conduz a um decréscimo significativo das propriedades adesivas (Kaji, 2000).

Todos estes mecanismos contribuem para uma diminuição das propriedades adesivas da membrana basal interferem com a migração das células basais epiteliais, podendo, deste modo, contribuir para a menor densidade destas células que observámos no nosso estudo, em doentes diabéticos.

Finalmente, importa referir que as alterações observadas nas córneas diabéticas incluem o espessamento da membrana basal. Nos seus estudos por microscopia electrónica, Rehany (Rehany, 2000) reportou alterações epiteliais que incluem o espessamento irregular e a multilaminação da membrana basal epitelial, observação

que confirma estudos anteriores (Kenyon, 1978). O espessamento da membrana basal foi atribuído ao aumento do *turnover* das células basais epiteliais (Vracko, 1974; Rehany, 2000), nomeadamente a uma taxa de diferenciação e maturação superior à observada em córneas normais. Esta observação pode também justificar a diminuição da densidade de células basais epiteliais em córneas diabéticas.

Os mecanismos acima discutidos sugerem que a diminuição da densidade de células basais epiteliais em córneas diabéticas seria acompanhada pelo aumento da densidade de células epiteliais superficiais. No nosso estudo, observámos uma densidade de células superficiais em córneas diabéticas, superior à medida em córneas normais (815 ± 260 vs 725 ± 171 ; média \pm desvio padrão). Contudo a diferença observada não foi estatisticamente significativa ($p = 0.5$). Face às variâncias observadas nas amostras de células epiteliais diabéticas e normais e ao tamanho dessas amostras, a mínima diferença detectável do nosso estudo era de 268 células/mm². Uma vez que não foi publicado qualquer outro estudo que reporte medidas da densidade de células epiteliais superficiais em córneas humanas, permanece por esclarecer se o aumento que observámos é real ou corresponde apenas a um artefacto. Conforme vimos, a pior repetibilidade para a camada epitelial superficial (repetibilidade intra-sessão) é de aproximadamente 80 células/mm². Consideremos que as variâncias das densidades de células epiteliais superficiais obtidas no nosso estudo, para as amostras de indivíduos saudáveis e diabéticos, são representativas das correspondentes populações. Neste caso, o tamanho mínimo da amostra necessário para detectar diferenças de densidade celular de 90 células/mm² (aproximadamente 10% acima do valor da repetibilidade intra-sessão) seria de 135 indivíduos por grupo. Será, pois necessário analisar 135 indivíduos saudáveis e 135 doentes diabéticos, com idades ajustadas, de forma a esclarecer se é real o aumento da densidade de células epiteliais superficiais nos diabéticos.

Este nosso estudo demonstra bem a capacidade da MCC para realizar medições quantitativas da morfologia corneana que podem justificar as observações clínicas. A diminuição da densidade das células basais epiteliais na córnea diabética pode explicar a diminuição da capacidade de cicatrização epitelial nestes doentes.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Obtivemos, para as córneas diabéticas, um perfil de variação da densidade de queratócitos ao longo do estroma semelhante ao que já havíamos observado em córneas normais, quando do estabelecimento e validação da nossa metodologia: densidade máxima junto à camada de Bowman; diminuição da densidade no estroma médio; aumento da densidade na região adjacente à membrana de Descemet. Como já discutimos, este perfil de variação nas córneas normais, não é unânime na literatura. Neste estudo (Quadrado, 2006) mais uma vez confirmámos o perfil de variação que tínhamos observado no estudo anterior (Popper, 2004) para córneas normais. Nas córneas diabéticas, a diminuição de densidade de queratócitos no estroma médio é menos pronunciada do que nas córneas normais. De facto, obtivemos um aumento da densidade de queratócitos no estroma médio da córnea diabética, quando comparada com a densidade da mesma camada em córneas normais. Esta diferença não é estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95%, por norma utilizado na literatura, embora se encontre muita próxima do limite de significância ($p=0.053$). Estes resultados sugerem que, no estroma médio, os diabéticos apresentam mais queratócitos que os indivíduos saudáveis, já que são vários os estudos que mostram que a espessura central da córnea se encontra aumentada nos diabéticos (Busted, 1981; Olsen, 1981; Pierro, 1993; McNamara, 1998; Lee, 2006). Um aumento de densidade volumétrica de queratócitos ($N_v = N/V$), definida como razão entre o número de queratócitos (N) e o volume da camada de estroma (V), a ocorrer em simultâneo com o aumento da espessura corneana implica necessariamente um maior número de queratócitos no estroma médio da córnea diabética. Está largamente documentado que o aumento da espessura da córnea nos diabéticos é proporcional à severidade da doença (Busted, 1981; Olsen, 1981; Pierro, 1993; Lee, 2006).

Uma explicação possível para o aumento da densidade de queratócitos no estroma médio das córneas diabéticas, quando comparado a mesma camada em córneas normais, será o aumento da concentração de glicose na córnea diabética, referido em diversos estudos (Foulks, 1979; Davies, 1984; Kaji, 2000). Uma maior concentração de glicose leva a um aumento da glicação não-enzimática e, consequentemente, a um nível mais elevado de AGEs (Sato, 2001; Kaji 2000).

Experiências *in vitro* com culturas de fibroblastos da derme humana demonstraram que os AGEs aumentam a expressão do CGTF (*Connective Tissue Growth Factor*) (Twigg, 2001). O CGTF é um potente agente pro-fibrótico que induz proliferação fibroblástica (Twigg, 2001). Assim sendo, é possível sugerir que o nível elevado de AGEs nas córneas diabéticas pode levar a uma concentração elevada de CTGF e a um aumento da proliferação fibroblástica. A proliferação fibroblástica aumentada amplifica o baixo estado nutricional no estroma médio dos diabéticos, resultando numa maior densidade de queratócitos por comparação com indivíduos normais.

Terminados estes trabalhos, demos por atingido um dos objectivos do nosso programa de investigação. De facto, desenvolvemos uma metodologia que permite quantificar a densidade das diferentes células, em cada uma das camadas corneanas, validámos a exactidão da metodologia, por comparação com exames histológicos e verificámos que precisão da metodologia, expressa nas medidas de repetibilidade intra- e inter-sessão permite a realização de estudos longitudinais. Mais ainda, aplicámos, com sucesso, a nossa metodologia na avaliação de córneas de diabéticos, tendo daqui resultado achados originais que contribuem de forma importante para a compreensão dos mecanismos que estão na origem da queratopatia diabética.

*Na realidade, em múltiplas condições clínicas a doença não se manifesta na córnea só por alterações na densidade celular, mas também por outro tipo de alterações, nomeadamente depósito de materiais anómalos, resposta inflamatória aumentada, anomalias da morfologia dos nervos e dos diferentes tipos de células, presença de neovasos, entre outras. Muitas destas alterações correspondem a desvios relativamente à microestrutura normal da córnea. Assim sendo, é óbvia a importância de possuir na prática clínica, uma ferramenta que nos permita visualizar *in vivo* a microestrutura da córnea com o detalhe e a fidelidade proporcionada pelos métodos histológicos. Desta forma, trata-se de disponibilizar para a observação clínica quotidiana o acesso imediato, em tempo real, da informação da microestrutura corneana, algo que a biomicroscopia não permite. Os clínicos habituaram-se à visualização de imagens histológicas sempre temporalmente desfasadas da clínica diária, uma vez que para serem obtidas, necessitam da excisão do tecido, de tempo de preparação e visualização microscópica. Perante as primeiras imagens obtidas *in vivo* por microscopia confocal da córnea, vislumbrámos que esta técnica poderia contornar esta condição. Havia que demonstrar que a MCC podia ser utilizada em doentes, para observar, em tempo real, estruturas com detalhe histológico.*

Avaliação em tempo real da microestrutura da córnea com patologia

O primeiro passo nesta direcção foi a confirmação da correspondência das medidas de densidades celulares, em todas as camadas da córnea, obtidas a partir de imagens histológicas com as mesmas medidas, realizadas sobre as imagens de microscopia confocal *in vivo*, conforme discutido anteriormente. Confiantes com os resultados obtidos, realizámos ainda outros estudos, nomeadamente sobre células altamente reflectivas, possivelmente células dendríticas, no estroma de doentes diabéticos (Quadrado, 2005) e avaliámos o plexo nervoso sub-basal, também em doentes diabéticos (Popper, 2005). Estes estudos confirmaram a capacidade da MCC para observar, com resolução histológica, alterações patológicas na microestrutura celular corneana, capacidade essa que nos permitiu alcançar resultados inovadores: foram os primeiros estudos a reportar a diminuição da densidade de nervos do plexo sub-basal logo nos estadios iniciais da diabetes e a presença de células hiperreflectivas, possivelmente células dendríticas, na vizinhança destes nervos e dos nervos estromais. Estes resultados foram posteriormente confirmados por outros autores (Midena, 2006) e a sua importância foi ainda muito recentemente salientada por Tavakoli, ao estudar a densidade de células de Langerhans e sua correlação com a severidade da neuropatia diabética (Tavakoli, 2011b), confirmando a nossa observação do aumento no número de células dendríticas em córneas diabéticas.

Paralelamente, utilizámos por diversas vezes a MCC, quer na nossa prática clínica, quer em investigações laboratoriais, para observar de imediato as estruturas da córnea. São exemplos, a sua utilização na avaliação pós operatória de doentes submetidos a cirurgia refractiva (Quadrado, 2006; Coelho, 2007; Quadrado, 2009), no transplante de córnea (queratoplastia penetrante e lamelar) (Quadrado, 2005; Quadrado, 2009), no diagnóstico e avaliação da eficácia terapêutica nas queratites, principalmente por Acanthamoeba e por fungos (Costa, 2009), nas distrofias corneanas (Quadrado, 2004), na avaliação da polineuropatia familiar hereditária tipo I (Rosa, 2009a; Rosa, 2009b) e de vários tipos de queratites.

Particularmente na queratite por acanthamoeba, a MCC revelou-se bastante útil, quer no diagnóstico quer na monitorização da evolução clínica. Esta patologia é de

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

difícil diagnóstico, uma vez que é uma entidade clínica rara, o que nos leva a um baixo índice de suspeição e se apresenta desde o início com sinais e sintomas inespecíficos. O nosso principal desafio nesta patologia é estabelecer um diagnóstico o mais precoce possível, para que desta forma o tratamento seja instituído de imediato. De facto, o principal factor prognóstico é a precocidade na instituição da terapêutica (Chiou, 1999; Garg, 2000; Dart, 2009; Kaiserman, 2012) que está dependente da confirmação diagnóstica. Dois estudos que realizámos demonstram a superioridade diagnóstica da MCC em relação ao exame microbiológico. No primeiro estudo (Costa, 2009), fizeram-se colheitas para exame microbiológico em 8 olhos, dos quais 6 (75%) tinham infecção por acantamoeba confirmada à MCC. Contudo, apenas num caso foi detectada a presença de quistos do parasita (16,6%). Os restantes foram negativos, o que demonstra a superioridade da MCC, relativamente aos exames microbiológicos, no diagnóstico desta patologia. O segundo estudo, realizado recentemente (Marques, 2012), confirmou esta superioridade: em doze olhos suspeitos, a MCC confirmou o diagnóstico de infecção por acantamoeba em 10 olhos (83.3%). O exame microbiológico realizado nestes 10 olhos só permitiu confirmar o diagnóstico em dois deles (20%). Confirma-se assim que a MCC é um auxiliar valioso no diagnóstico precoce desta patologia. Permite a detecção de quistos patognomónicos da infecção por acantamoeba, mesmo quando os exames microbiológicos são inconclusivos. É um exame realizado *in vivo*, que evita o traumatismo corneano adicional inerente à colheita de amostras (Garg, 2000; Gopinathan, 2002) e o diagnóstico é imediato, evitando o atraso no início da terapêutica. Permite o diagnóstico diferencial com queratites fúngicas, conforme também demonstrámos (Costa E, 2009).

Ao permitir, conforme referimos, a visualização dos quistos da acantamoeba, a MCC pode ser usada para monitorizar a evolução da patologia e a eficácia da terapêutica instituída, um aspecto que nos parece fundamental, dada a necessidade de tratamentos muito prolongados.

Uma outra patologia onde explorámos a capacidade da MCC para observar a microestrutura corneana com detalhe histológico foi a Polineuropatia Amiloidótica Familiar do tipo português (PAF tipo I). Vários factores concorreram para este

propósito: a origem portuguesa desta doença; o facto de serem referenciados, para o nosso serviço, um grande número de doentes com esta patologia; a nossa constatação de uma elevada incidência de úlceras neurotróficas nas fases avançadas da doença, sugerindo alterações celulares e neurológicas corneanas subjacentes; a dificuldade que sentimos no tratamento destas úlceras; o facto de existirem à data estudos que reportavam a observação por MCC de depósitos de amilóide e linhas *lattice* e alterações das células e nervos corneanos noutras polineuropatias amiloidóticas familiares (Rosenberg, 2001; Rothstein, 2002). Pretendíamos verificar se era possível detectar alterações estruturais passíveis de serem precursoras das úlceras neurotróficas e se eram observados depósitos de amilóide. Ao avançarmos para este estudo, estávamos ainda conscientes da escassa literatura relativa às alterações corneanas na PAF tipo I. De facto, as alterações oculares mais frequentemente descritas para estes doentes dizem respeito a outras estruturas oculares que não a córnea (Silva-Araújo, 1993; Andoa, 1997; Beirão, 2011).

Assim, avaliamos, por MCC, as alterações celulares, dos nervos e a presença de depósitos de amilóide, em vinte olhos de dez doentes com PAF tipo I (Rosa, 2009a; Rosa, 2009b). Não observámos linhas *lattice* nem depósitos de amilóide em nenhum dos doentes estudados. Os queratócitos apresentavam morfologia e dimensões normais e não foram detectadas alterações no número ou morfologia das células endoteliais. Também não foram detectadas alterações na morfologia do plexo nervoso sub-basal, contrariamente ao que foi observado por Rosenberg em doentes com PAF tipo IV (Rosenberg, 2001). Sublinha-se, no entanto, que a mutação envolvida neste tipo de PAF é diferente da encontrada nos doentes observados. Observámos proeminência dos nervos corneanos e distribuição anárquica e desorganização dos nervos estromais, no estroma posterior. A proeminência dos nervos corneanos está descrita quer em doenças do armazenamento (como o Síndrome de Refsum em que existe acumulação de ácido fitânico), quer em neuropatias autonómicas e sensoriais, como a Disautonomia Familiar (Síndrome de Riley-Day). É possível que a presença de nervos corneanos proeminentes e alguns deles com distribuição anárquica a nível do estroma posterior, esteja relacionada com a polineuropatia. A desorganização estrutural a nível dos nervos corneanos posteriores, pode também reflectir o

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

atingimento dos nervos periféricos que é característico da doença. É lícito propor que estas alterações neurológicas sejam precursoras dos defeitos epiteliais persistentes e úlceras neurotróficas frequentes nestes doentes. Sendo possível detectar, por MCC, estas alterações microestruturais da córnea, abre-se a possibilidade de instituir precocemente um tratamento dirigido que previna o aparecimento das úlceras neurotróficas. Como referido anteriormente, a utilização de factores neurotróficos no tratamento deste tipo de úlceras é uma área de investigação clínica bastante activa e promissora, onde estamos bastante envolvidos.

Nos estudos que anteriormente apresentámos, as estruturas corneanas observadas por MCC nunca foram por nós comparadas com observações histológicas do mesmo tecido. Contudo, para nós foi sempre claro que as imagens obtidas por MCC correspondiam às imagens histológicas que aprendemos a visualizar na nossa formação académica e posteriormente na prática clínica. A oportunidade de fazer um estudo comparando imagens de MCC com imagens histológicas, no mesmo tecido, surgiu em resultado de uma publicação que reportava novas estruturas da microanatomia do limbo (Dua, 2005). Devido ao impacto potencial destas observações na actividade clínica do nosso Serviço de Oftalmologia, dado que efectuamos um grande número de transplantes queratolímbicos (Murta, 2005), surgiu a necessidade de confirmarmos tais observações e verificar se elas poderiam ser realizadas quotidianamente por MCC. Caso tal fosse possível, teríamos a vantagem de podermos observar e quantificar as células límbicas nas zonas que clinicamente apresentavam sinais de insuficiência límbica, bem como nas potenciais zonas dadoras de limbo. Neste caso, poderíamos efectuar a colheita de limbo numa forma dirigida ao local com maior quantidade de células estaminais e determinar o risco de originar uma nova zona de insuficiência límbica na zona dadora.

Desta forma, efectuámos um estudo laboratorial para avaliação das palissadas de Vogt no limbo humano, em que comparámos os resultados das imagens obtidas com MCC em treze anéis corneoesclerais de nove dadores de córnea, provenientes do Banco de Olhos do Serviço de Oftalmologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, com as imagens histológicas (Costa, 2011). As observações permitiram-nos verificar a

correspondência dos achados, em ambas as técnicas, quer a nível do tipo de estruturas identificadas, quer a nível da respectiva localização.

As palissadas de Vogt, como estruturas macroscópicas, nem sempre são visíveis no exame biomicroscópico (Townsend, 1991; Patel, 2006; O'Sullivan, 2007). Na nossa série, a sua presença ao exame biomicroscópico, foi considerada duvidosa em cinco dos treze anéis. Uma das causas plausíveis para a sua ausência poderá ser os artefactos resultantes da permanência dos botões córneo-esclerais no meio de conservação ou a inexistência de conjuntiva suficiente por esta ter sido removida durante o processamento. Durante a trepanação da córnea, a conjuntiva é meticulosamente removida e com ela certamente grande parte destas estruturas. De facto, nos globos oculares não processados e nos botões córneo-esclerais, a conjuntiva remanescente permitiu a fácil identificação das palissadas de Vogt. Já nos anéis obtidos após trepanação da córnea, a sua identificação foi duvidosa em mais de metade dos casos. Por este motivo, alguns autores aconselham a manter os 2-3 mm de conjuntiva perilímbica quando se pretende realizar transplante de limbo (Dua, 2010).

O facto de não visualizarmos as palissadas de Vogt por biomicroscopia, não significa que elas não estejam presentes a nível microscópico (Townsend, 1991). Tal demonstra que a biomicroscopia é um exame insuficiente para a sua identificação, obrigando-nos a procurar outros métodos. A MCC permitiu identificar palissadas de Vogt em 60% dos falsos negativos do exame biomicroscópico. Verificou-se assim que a capacidade de detecção destas estruturas através da MCC (76,9%) aproxima-se dos valores proporcionados pelo exame histológico (92,3%) e é comparável aos valores reportados por Zheng et al. (77.5%), para um grupo etário correspondente ao avaliado no nosso estudo (Zheng, 2008). A percentagem que obtivemos para a detecção de palissadas por biomicroscopia (61.5%), é inferior à reportada por Patel (84%) (Patel, 2006) numa população com idades próximas às das córneas por nós observadas. Contudo estes valores não podem ser comparados directamente uma vez que as córneas doadas utilizadas no nosso estudo provinham de europeus brancos e o estudo de Patel foi realizado num grupo que incluía também indivíduos de origem africana,

indiana e maori. Conforme o autor reporta, todas as córneas onde não foram observadas as palissadas de Vogt eram de europeus brancos, o que mostra a importância da pigmentação na observação destas estruturas por biomicroscopia. Tal é confirmado por Miri que, num grupo de 23 olhos de 17 indivíduos de origem Europeia, Africana e Indiana, e idade média 56 ± 18 anos, apenas observou, por biomicroscopia, as palissadas em 6 olhos (Miri, 2012). Importa ainda referir que Patel avaliou as córneas *in vivo*, ao passo que o nosso trabalho foi realizado em córneas doadas, parecendo-nos que o meio e o tempo de conservação podem influenciar a visualização por biomicroscopia das palissadas. A excisão total do tecido conjuntival nas córneas doadas pode igualmente afectar a visualização destas estruturas, conforme mostram os nossos resultados.

Neste estudo, foi igualmente possível identificar as três microestruturas que tinham sido recentemente descritas na literatura: *criptas epiteliais límbicas* (Dua, 2005), *criptas límbicas* e *projeções focais estromais* (Shortt, 2007). Obtivemos imagens compatíveis com as criptas límbicas e as projeções focais estromais tanto na MCC como na histologia. No entanto as criptas epiteliais límbicas não foram observadas em MCC, tendo sido apenas detectadas ao exame histológico. Na literatura não se encontram quaisquer referências a imagens de MCC das criptas epiteliais límbicas. Um trabalho de Zheng (Zheng, 2008) descreve uma imagem de MCC como podendo corresponder a uma cripta epitelial límbica, uma vez que relata um cordão de células epiteliais, repleto de pequenas células hiper-reflectivas, com extensão lateral e de forma irregular. Zheng especula sobre o facto de esta estrutura poder corresponder às criptas epiteliais límbicas descritas por Dua (Dua, 2005). As criptas epiteliais límbicas foram detectadas na nossa série, em cortes histológicos radiários, embora raramente (3 córneas em 13 observadas). Já Shortt (Shortt, 2007) não encontrou essas estruturas em nenhuma das córneas examinadas por microscopia confocal *in vitro*. Segundo Dua (Dua, 2005), existem em média cerca de 6 criptas epiteliais límbicas por olho, que serão melhor individualizadas por técnicas de imunohistoquímica. Na nossa opinião, o facto de não terem sido realizados cortes histológicos seriados, ao contrário do que fez Dua, justifica, provavelmente, o baixo número de observações no nosso estudo. A ausência de observações por MCC de

criptas epiteliais límbicas é justificável. Por um lado a sua baixa densidade dificulta a sua visualização. Por outro lado, as observações histológicas foram sempre feitas em cortes radiários, enquanto que as técnicas de microscopia confocal *in vivo* da córnea apenas permitem obter cortes tangenciais. No futuro, será útil identificar as criptas epiteliais límbicas em cortes histológicos tangenciais de forma a estabelecer a morfologia destas estruturas numa imagem tangencial.

As criptas límbicas descritas por Shortt (Shortt, 2007) parecem corresponder às “*rete ridges*” descritas muito antes por Townsend (Townsend, 1991) isto é, projecções de epitélio estratificado para a profundidade, na direcção do estroma, envoltas por estroma altamente celular que forma elevações papilares (as palissadas de Vogt, segundo Townsend). No nosso estudo, foram identificadas criptas límbicas quer em histologia, quer em MCC, sendo que, na MCC, observaram-se criptas límbicas sempre que se detectaram palissadas (n=10). As criptas límbicas são uma estrutura facilmente observável por MCC, em indivíduos normais, confirmando-se os resultados obtidos por Shortt (Shortt, 2007).

Quanto às projecções focais estromais, a descrição feita pelos próprios autores é sobreponível à definição de palissada de Vogt: projecções estromais em dedo de luva rodeadas por uma camada compacta de células pequenas – e que corresponde à camada basal do epitélio límbico.

Conforme atrás referimos, um adequado conhecimento da região límbica é fundamental uma vez que o transplante de células estaminais epiteliais é considerado o tratamento ideal para insuficiência límbica (Dua, 2010). Isto é verdadeiro quer para o transplante autólogo de limbo, quer para o transplante autólogo de células límbicas expandidas *ex vivo*. Estudos com a utilização de transplante autólogo de células límbicas expandidas *ex vivo* mostraram resultados a curto prazo (1 a 2 anos de seguimento) variando de 46% a 100% de sucesso na reconstrução da superfície ocular (Pellegrini, 1997; Schwab, 2000; Cristovam, 2008; Melo, 2007; Thanos, 2010; Rama, 2010; Sangwan, 2011). Recentemente, Daya (Daya, 2005) publicou uma série de 10 doentes com insuficiência límbica, que foram submetidos a transplante de células límbicas alogénicas cultivadas *ex vivo*, obtendo 70% de sucesso após 28 meses de

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

seguimento. O sucesso deste tipo de transplante tem sido confirmado em alguns centros de investigação, nomeadamente pelos resultados do grupo de investigadores do Instituto LV Prasad – Índia, com o qual mantemos estreita colaboração nesta área de investigação. Actualmente, seguimos o protocolo de cultura de células estaminais desenvolvido nesse Instituto (Mariappan, 2010). As células epiteliais podem ser isoladas a partir de tecido dador límbico e expandidas em cultura sobre membrana amniótica (Fatima, 2006). Num estudo retrospectivo de 200 doentes com deficiência total unilateral de células límbicas, Sangwan reporta a re-epitelização completa da superfície corneana, apresentando-se esta avascular e clinicamente estável em 71% dos olhos, com tempo médio de seguimento de 3 anos (Sangwan, 2011).

Tendo nós confirmado que a MCC permite observar a zona límbica com detalhe histológico suficiente, foi colocada a hipótese desta técnica ser útil na monitorização do limbo dador na cirurgia de *pterygium* com transplante de limbo autólogo (CLAU). Esta hipótese foi validada pelo nosso estudo (Pereira, 2011) onde avalíamos o comportamento do limbo dador, quer clinicamente, quer através de MCC, nos indivíduos submetidos a CLAU por *pterygium* primário ou recorrente. Numa análise retrospectiva de 142 olhos (127 doentes), avalíamos a zona dadora que foi classificada morfológicamente à biomicroscopia como: Grau A – ausência de alterações límbicas; Grau B – neovascularização corneana superior a 1mm; Grau C – formação de *pseudopterygium*. Foi efectuada MCC no local da zona dadora em 50 olhos (40 Grau A; 5 Grau B e 5 Grau C). Nestes olhos foi demonstrada a existência de: pleomorfismo epitelial e de fibrose sub-epitelial com vascularização superficial localizada em 100% dos casos; interrupção da membrana basal epitelial em 47 olhos (94%); células dendríticas no epitélio/zona sub-epitelial em 18 olhos (36%); células de caliciformes na superfície epitelial corneana em 4 olhos (8%) e persistência de palissadas de Vogt na zona dadora em 3 olhos (6%).

Os resultados deste estudo mostram que a avaliação por MCC permite a identificação de achados compatíveis com o contexto cicatricial normal (pleomorfismo de células epiteliais, fibrose sub-epitelial e neovascularização) e com o processo

inflamatório pós-cirúrgico (presença de células dendríticas), a visualização de detalhes micro-estruturais resultantes do processo cirúrgico (interrupção da membrana basal e ausência de palissadas de Vogt na zona dadora) e ainda o diagnóstico de insuficiência límbica, pela presença de células caliciformes na superfície do epitélio corneano. Daqui se conclui que a MCC permite monitorizar o limbo dador no CLAU já que possibilita a visualização e quantificação das diversas alterações morfológicas decorrentes da cirurgia. Decorre imediatamente desta conclusão que é possível monitorizar, por MCC, a falência da zona límbica dadora. Tal constitui um desenvolvimento de elevado impacto clínico.

Tradicionalmente, a detecção definitiva da conjuntivalização, que ocorre na insuficiência límbica, assenta na técnica de citologia de impressão (Puangsricharern, 1995). No entanto, conforme já demonstrado por Le em doentes com queimaduras químicas, a MCC pode substituir a citologia de impressão na detecção das células caliciformes, uma vez que as densidades celulares medidas por MCC, quer na conjuntiva, quer na córnea, exibem correlações fortes com as densidades de células caliciformes medidas por citologia de impressão (Le, 2010). Conforme vimos no nosso estudo, a MCC permite a detecção de células caliciformes mesmo em doentes sem sinais clínicos de insuficiência límbica.

A utilização da MCC na análise da insuficiência límbica foi confirmada por outros trabalhos, como os de Deng em 2012 e de Hong em 2011, que alargaram a análise a outros aspectos morfológicos da insuficiência límbica. Deng (Deng, 2012) refere que a MCC permite analisar em pormenor a estrutura celular do epitélio corneano e plexo sub-basal nos doentes com deficiência de células límbicas. Também Hong, num estudo com 21 doentes (Hong, 2011) confirmou a utilidade da MCC na prática clínica, particularmente no diagnóstico da falência de transplantes de limbo alogénicos, ao monitorizar as alterações celulares corneanas. Hong demonstrou, nos casos de falência do transplante, a perda do aspecto poligonal das células basais epiteliais na córnea central, bem como a diminuição da densidade das células epiteliais límbicas e células epiteliais da córnea central e um aumento do número de células dendríticas.

Do que acima dissemos, resulta que a MCC permite avaliar a segurança do CLAU.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Antes de realizar este trabalho, tínhamos a convicção que o CLAU era um procedimento seguro, convicção suportada em estudos clínicos que já havíamos efectuado (Torres, 2008). Contudo sentíamos a necessidade de alicerçar tal convicção em análises micro-estruturais da zona dadora. A MCC ofereceu-nos tal possibilidade. Os achados que nos levaram a concluir pela segurança do CLAU foram a visualização e confirmação da manutenção de algumas palissadas de Vogt, na zona dadora, e a baixa incidência de células de caliciformes na córnea. Esta conclusão contraria a opinião de alguns autores (Chen, 1990; Chen, 1991) que referem a possibilidade do CLAU levar a insuficiência límbica localizada na zona dadora, mas é suportada por estudos mais recentes, em que a manipulação de tecido límbico no dador vivo se revelou um procedimento seguro, não se observando, por citologia de impressão, invasão conjuntival para além do limite da queratectomia na zona dadora (Han 2007, Barros, 2011).

Estes resultados permitiram-nos realizar com segurança clínica o autotransplante queratolímbico no tratamento do *pterygium* e avançar para estudos laboratoriais, que entretanto publicámos (Torres, 2011).

Desta discussão resulta evidente o impacto clínico proporcionado pela capacidade de observação *in vivo* com detalhe histológico conferida pela MCC. Particularmente a nível límbico, conseguimos uma correspondência das imagens da MCC com imagens histológicas, com um grau de certeza semelhante ao do exame anatomo-patológico e superior à avaliação biomicroscópica. Tal como nós, Dua em 2012 (Dua, 2012) confirmou a vantagem da MCC na avaliação *in vivo* do limbo normal. Numa era em que as terapias celulares ganham importância crescente no tratamento da insuficiência límbica, a utilização de métodos de imagem não invasivos para realização de biópsias dirigidas, poderá revelar-se essencial para o sucesso dos transplantes de células expandidas *ex vivo*.

Era igualmente importante para nós verificar se a MCC teria a capacidade para monitorizar ao nível celular a eficácia terapêutica de fármacos tópicos. Esta monitorização, tradicionalmente realizada por biomicroscopia, tinha insuficiências

evidentes que advinham sobretudo da baixa resolução espacial inerente a esta técnica. De acordo com este raciocínio, efectuámos o estudo clínico de uma doente com Cistinose, em que avaliamos o efeito do colírio de cisteamina no tratamento dos depósitos de cristais corneanos.

Grupcheva (Grupcheva, 2002) confirmou a visualização dos cristais de cistina na córnea através da MCC. Neste estudo, Grupcheva define com detalhe os cristais. Junto à Descemet, os cristais são densos e poliédricos, com diâmetro longitudinal de $85\pm 37\ \mu\text{m}$ e o diâmetro transversal de $43\pm 29\ \mu\text{m}$. Nas camadas mais superficiais da córnea, alguns cristais maiores surgem mais hiper-reflectivos e os cristais mais pequenos apresentavam aspecto em agulha tal como referido por Simpson (Simpson, 2011). No estroma anterior os cristais entrecruzam-se e apresentam um diâmetro longitudinal de $57\pm 41\ \mu\text{m}$ e transversal de $21\pm 17\ \mu\text{m}$. A MCC revelou maior densidade dos cristais anterior e menor densidade no estroma médio. Este trabalho vem provar a aplicação da MCC para análise – qualitativa e quantitativa – dos cristais de cistina em indivíduos com cistinose nefropática. A biomicroscopia ultrassónica (UBM) também tem sido utilizada no estudo desta patologia (Mungan, 2000). A vantagem desta técnica é a possibilidade de avaliação duma área maior de córnea, bem como de outras estruturas como a conjuntiva, a esclera, câmara anterior, iris e cristalino. No entanto, apresenta uma ampliação menor que a MCC, comparável à do exame biomicroscópico, permitindo apenas resultados semi-quantitativos da morfologia dos cristais corneanos. A UBM é excelente na avaliação do ângulo, malha trabecular e processo ciliares, avaliação que deve ser tomada em linha de conta nestes doentes, uma vez que apresentam uma taxa elevada de glaucoma.

Também aqui comprovámos a capacidade da MCC na avaliação de detalhes histológicos. Uma avaliação das imagens obtidas, utilizando um programa de análise de imagens de livre acesso (ImageJ, National Institutes of Health, EUA) permitiu obter o valor de $62.9 \pm 10.2\ \mu\text{m}$ para o comprimento longitudinal dos cristais de cistina, valor comparável ao reportado por Grupcheva (Grupcheva, 2002). No nosso estudo e à semelhança de outros, a administração tópica de gotas de cisteamina leva a uma grande diminuição das queixas de fotofobia e blefaroespasma, mesmo quando a

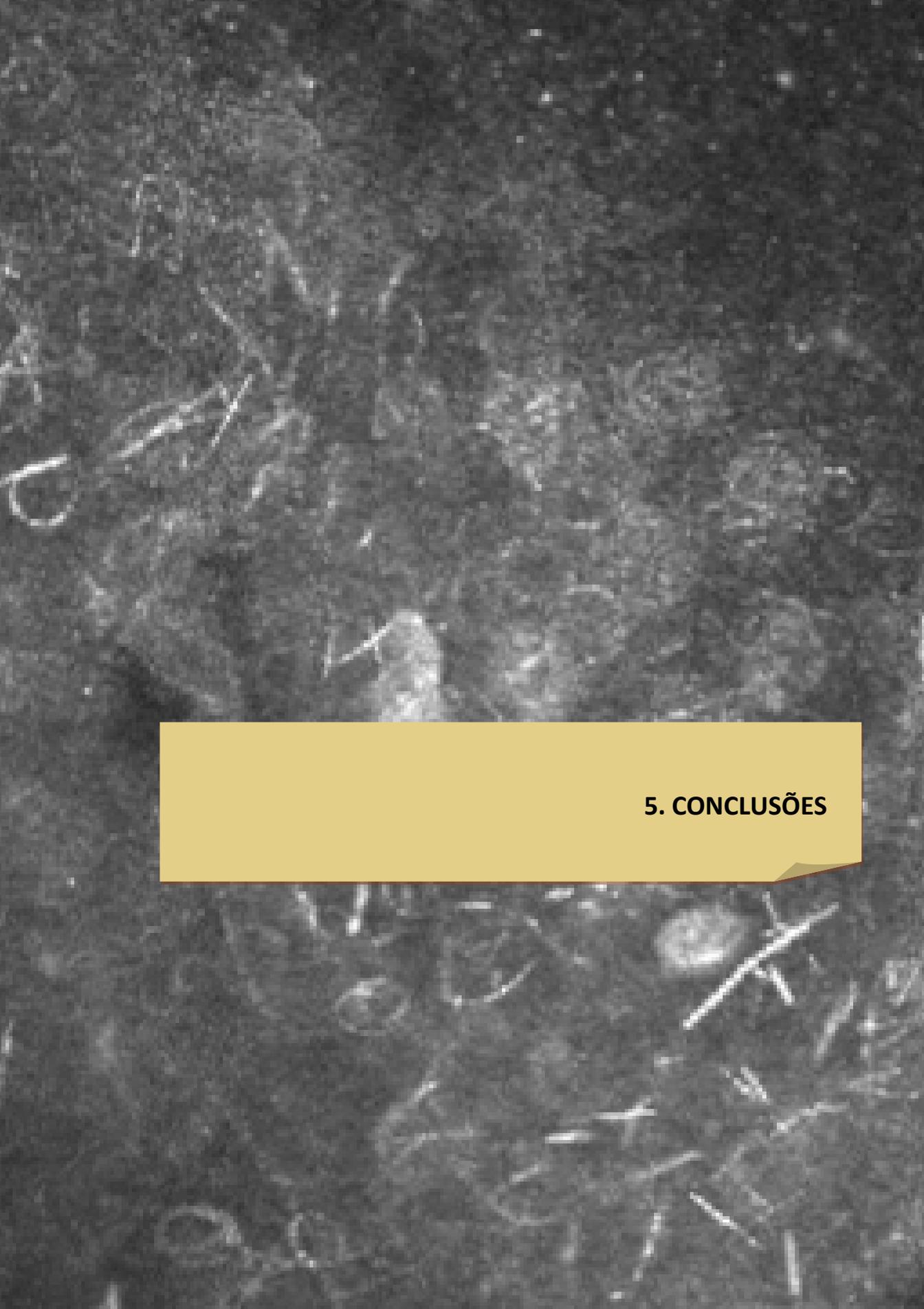
AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

doença tem início na idade adulta (Khan, 2004; Gahl, 2000). Esta terapia, que parece ser mais efectiva quanto mais cedo for iniciada e quando iniciada antes dos dois anos de idade, pode na realidade dissolver completamente os cristais corneanos (Gahl, 2000; Gahl, 2001).

A maioria dos estudos utiliza o exame biomicroscópico para a avaliação da densidade dos cristais corneanos de cistina. Em 1998, Iwata (Iwata, 1998) utilizou fotografias de biomicroscopia para análise destes cristais e refere uma melhoria significativa após 8 a 20 meses de aplicação tópica das gotas de cisteamina. Gahl, em 2000 (Gahl, 2000), utilizou um sistema gradativo da quantidade de cristais corneanos de cistina, baseado também em fotografias obtidas através do exame biomicroscópico (Gahl, 2000). Neste estudo, Gahl concluiu que a administração de 0.55% de gotas de cisteamina, na dose de 6 a 12 vezes ao dia, dissolveu os cristais de cistina em 10 doentes, com idade entre os 1 e 32 anos, entre os 8 e 41 meses. Também Tsilou (Tsilou, 2003) revelou melhoria na densidade dos cristais após 1 ano, com um tempo mínimo de 6 meses. No nosso estudo detectámos uma melhoria logo aos três meses de tratamento. Neste enquadramento, somos de opinião que a MCC aportou uma mais-valia, pela maior capacidade de definição das microestruturas corneanas e daí a explicação para o facto de termos detectado uma grande redução na densidade dos cristais, ao terceiro mês de terapia e uma estabilização do efeito até ao final da avaliação que foi de 1 ano. O tempo mínimo para se obter um resultado benéfico parece corresponder ao período entre o 3º e 6º mês de tratamento, opinião que é suportada por outros estudos (Kaiser-Kupfer, 1987; Simpson, 2011).

Demonstrámos que a MCC é uma ferramenta útil na detecção precoce, avaliação da morfologia, na natureza e localização dos cristais corneanos de cistina. Ao isolar a área de observação, a MCC oferece a vantagem de minimizar o efeito reflectivo dos cristais das regiões adjacentes e num futuro próximo pode providenciar muita informação sobre a história natural da deposição dos cristais ao longo das diferentes camadas estromais nos doentes com cistinose. Demonstramos aqui a sensibilidade da MCC na avaliação da eficácia da terapêutica tópica e desta forma, a possibilidade de vir preencher a lacuna que existia nesta área. A MCC, pelo facto de poder ser

rapidamente realizada numa forma sequencial ao longo do tempo, é um método sensível para avaliação em humanos das terapias de inibição e/ ou remoção dos cristais já existentes, bem como de outras que venham a surgir.

The image features a dark, almost black background with a complex, fibrous texture. The texture consists of numerous thin, light-colored fibers or strands that are scattered and intertwined, creating a dense, organic-looking pattern. In the lower right quadrant, there is a bright yellow rectangular box with a slightly irregular, torn-edge appearance on its bottom right corner. Inside this box, the text "5. CONCLUSÕES" is written in a bold, black, sans-serif font.

5. CONCLUSÕES

1. É possível medir *in vivo*, com exactidão, a densidade volumétrica de queratócitos , as densidades superficiais das células epiteliais superficiais e basais e das células endoteliais, com um microscópio confocal da córnea do tipo de varrimento de fenda.
2. A repetibilidade associada à determinação de densidades celulares por MCC permite a utilização desta técnica na avaliação clínica e seguimento de doentes, na avaliação da eficácia das terapêuticas instituídas e ainda na realização de ensaios clínicos longitudinais.
3. As densidades celulares em córneas normais que medimos em cada uma das camadas corneanas integram os valores de referência utilizados pela comunidade científica.
4. A capacidade da MCC para observar, com resolução histológica, alterações patológicas na microestrutura celular corneana, proporcionou resultados inovadores na observação da córnea diabética, que contribuem de forma importante para a compreensão dos mecanismos que estão na origem da queratopatia diabética:
 - a. a densidade de células basais epiteliais é significativamente inferior à observada nos indivíduos saudáveis, o que contribui para a diminuição da capacidade de cicatrização epitelial nestes doentes.
 - b. a diminuição da densidade de nervos do plexo sub-basal ocorre nos estadios iniciais da doença.
 - c. células hiper-reflectivas, possivelmente células dendríticas, estão presentes na vizinhança dos nervos do plexo sub-basal e dos nervos estromais.
 - d. a diminuição de densidade de queratócitos no estroma médio é menos pronunciada do que nas córneas normais, sugerindo que os diabéticos apresentam mais queratócitos nesta região do que os indivíduos saudáveis.
5. A MCC tem capacidade para realizar medições quantitativas da morfologia corneana que podem justificar as observações clínicas.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

6. A MCC permite observar a zona límbica com detalhe histológico, quer a nível do tipo de estruturas identificadas, quer a nível da respectiva localização.
7. A MCC permite monitorizar o limbo dador no CLAU e a sua eventual falência, pela detecção de células calciformes na superfície do epitélio corneano, substituindo com vantagem a citologia de impressão.
8. O CLAU é um procedimento clínico seguro conforme demonstrado pela visualização e confirmação da manutenção de palissadas de Vogt na zona dadora e pela baixa incidência de células de calciformes na córnea, no exame por MCC.
9. A MCC é uma ferramenta útil na detecção precoce, avaliação da morfologia, da natureza e localização dos cristais corneanos de cistina.
10. A MCC permite a avaliação da eficácia de terapêuticas tópicas, pois pode ser realizada rapidamente e duma forma sequencial ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

- Abdelkader A, Elewah el-SM, Kaufman HE. Confocal microscopy of corneal wound healing after deep lamellar keratoplasty in rabbits. *Arch Ophthalmol*. 2010 Jan;128(1):75-80.
- Abdelkader A, Kaufman HE. Descemetic versus pre-descemetic lamellar keratoplasty: clinical and confocal study. *Cornea*. 2011 Nov;30(11):1244-52.
- Abercrombie M: Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*. 1946 94:239–247.
- Ahmad S, Osei-Bempong C, Dana R, Jurkunas U. The culture and transplantation of human limbal stem cells. *J Cell Physiol*. 2010 Oct;225(1):15-91.
- Ahmed A, Bril V, Orszag A, Paulson J, Yeung E, Ngo M, Orlov S, Perkins BA. Detection of Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy by Corneal Confocal Microscopy in Type 1 Diabetes: A concurrent validity study. *Diabetes Care*. 2012 Apr;35(4):821-8.
- Ahmed N. Advanced glycation end-products-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005 Jan;67(1):3-21
- Akagi Y, Yajima Y, Kador PF, Kuwabara T, Kinoshita JH. Localization of aldose reductase in the human eye. *Diabetes*. 1984 Jun;33(6):562-6.
- Akpek EK, Foster CS. Limbal stem-cell transplantation. *Int Ophthalmol Clin*. 1999 Winter;39(1):71-82.
- Alhatem A, Cavalcanti B, Hamrah P. *In vivo* confocal microscopy in dry eye disease and related conditions. *Semin Ophthalmol*. 2012 Sep-Nov;27(5-6):138-48.
- Aloea L, Tirassaa P, Lambiase A. The topical application of nerve growth factor as a pharmacological tool for human corneal and skin ulcers. *Pharmacological Research*. 2008 Apr;57(4):253-8.
- Alomar TS, Al-Aqaba M, Gray T, Lowe J, Dua HS. Histological and confocal microscopy changes in chronic corneal edema: implications for endothelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Oct 17;52(11):8193-207.
- Alsuhaibani AH, Khan AO, Wagoner MD. Confocal microscopy of the cornea in nephropathic cystinosis. *Br J Ophthalmol*. 2005 Nov;89(11):1530-1.
- Amano S, Shimizu K, Tsubota K. Corneal epithelial changes after excimer laser photorefractive keratectomy. *Am J Ophthalmol*. 1993 Apr 15;115(4):441-43.
- Amos WB, White JG, Fordham M. Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Appl Optics*. 1987 Aug 15;26(16):3239-43.
- Amoozadeh J, Aliakbari S, Behesht-Nejad AH, Seyedian MA, Rezvan B, Hashemi H. Confocal microscopy of corneal stroma and endothelium after LASIK and PRK. *J Refract Surg*. 2009 Oct;25(10 Suppl):S963-7
- Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy: familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain*. 1952 Sep;75(3):408-27.
- Andoa E, Andob Y, Okamura R, Uchinoc M, Andob M, Negia A. Ocular manifestations of familial amyloidotic polyneuropathy type I: long term follow up. *Br J Ophthalmol*. 1997 Apr;81(4):295-8.
- Andrews PM, Petroll WM, CavanaghHD, Jester JV. *Am J Anat*. 1991 May;191(1)95-102.
- Anikster Y, Lucero C, Guo J, Huizing M, Shotelersuk V, Bernardini I, McDowell G, Iwata F, Kaiser-Kupfer MI, Jaffe R, Thoene J, Schneider JA, Gahl WA. Ocular nonnephropathic cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations. *Pediatr Res*. 2000 Jan;47(1):17-23.
- Anshu A, Planchard B, Price MO, da R Pereira C, Price FW Jr. A Cause of Reticular Interface Haze and its Management After Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty. *Cornea*. 2012 Dec;31(12):1365-8.
- Argüeso P, Gipson IK. Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res*. 2001 Sep;73(3):281-9.
- Attard M, Jean G, Forestier L, Cherqui S, van't Hoff W, Broyer M, Antignac C, Town M. Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the CTNS gene: predicted effect on the model of cystinosin. *Hum Mol Genet*. 1999 Dec;8(13):2507-14.
- Auböck J, Irschick E, Romani N, Kompatscher P, Höpfl R, Herold M, Schuler G, Bauer M, Huber C, Fritsch P. Rejection after a slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-free allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans. *Transplantation*. 1988 Apr;45(4):730-7.
- Auran JD, Starr MB, Koester CJ, Labombardi VJ. In-Vivo Scanning Slit Confocal Microscopy of Acanthamoeba-Keratitis - A Case-Report. *Cornea*. 1994 Mar;13(2):183-5.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

- Auran JD, Koester CJ, Kleiman NJ et al. Scanning Slit Confocal Microscopic Observation of Cell Morphology and Movement within the Normal Human Anterior Cornea. *Ophthalmology*. 1995 Jan;102(1):33-41.
- Awata T, Sogo S, Yamamoto Y. Effects of aldose reductase inhibitor, CT-112, on sugar alcohol accumulation in corneal epithelium of galactosefed rats. *Jpn J Ophthalmol*. 1986;30(3):245-50.
- Awata T, Sogo S, Yamagami Y, Yamamoto Y. Effect of an aldose reductase inhibitor, CT-112, on healing of the corneal epithelium in galactose-fed rats. *J Ocul Pharmacol*. 1988 Fall;4(3):195-201.
- Awwad ST, Haddad W, Wang MX, Parmar D, Conger D, Cavanagh HD. Corneal intrastromal gatifloxacin crystal deposits after penetrating keratoplasty. *Eye Contact Lens*. 2004 Jul;30(3):169-72.
- Azar DT, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK. Decreased penetration of anchoring fibrils into the diabetic stroma. A morphometric analysis. *Arch Ophthalmol*. 1989 Oct;107(10):1520-3.
- Azar DT, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, et al. Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. *Arch Ophthalmol*. 1992 Apr;110(4):537-40.
- Bacallao RBM. In: Book of biological confocal microscopy, vol. 1. New York: Plenum Press; 1990.
- Ban Y, Ogawa Y, Ibrahim OM, Tatematsu Y, Kamoi M, Uchino M, Yaguchi S, Dogru M, Tsubota K. Morphologic evaluation of meibomian glands in chronic graft-versus-host disease using *in vivo* laser confocal microscopy. *Mol Vis*. 2011 17:2533-43.
- Banning CS, Larson PM, Randleman JB Outcome of LASIK in fleck corneal dystrophy. *Cornea*. 2006 Dec;25(10):1262-4
- Barge A, Ruggiero F, Garrone R. Structure of the basement membrane of corneal epithelium: quick-freeze, deep-etch comparative study of networks deposited in culture and during development. *Biol Cell*. 1991 72(1-2):141-7.
- Barros JN, Santos MS, Barreiro TR, Belfort JrR, Gomes JA. Cytological features of live limbal tissue donor eyes for autograft or allograft limbal stem cell transplantation. *Arq. Bras. Oftalmol*. 2011 Jul-Aug;74(4):248-50.
- Baum JP, Maurice DM, McCarey BE. The active and passive transport of water across the corneal endothelium. *Exp Eye Res*. 1984 Sep;39(3):335-42.
- Beirão NM, Matos E, Beirão I, Costa PP, Torres P. Recurrence of vitreous amyloidosis and need of surgical reintervention in Portuguese patients with familial amyloidosis ATTR V30M. *Retina*. 2011 Jul-Aug;31(7):1373-7.
- Benítez-Del-Castillo JM, Acosta MC, Wassfi MA, Díaz-Valle D, Gegúndez JA, Fernandez C, García-Sánchez J. Relation between corneal innervation with confocal microscopy and corneal sensitivity with noncontact esthesiometry in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Jan;48(1):173-8.
- Berlau J, Becker H-H, Stave J, Oriwol C, Guthoff TF. Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas. *J Cataract Refract Surg*. 2002 Apr;28(4):611-6.
- Beuerman RW, Schimmelpfennig B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol*. 1980 Jul;69(1):196-201.
- Beuerman RW, Laird JA, Kaufman SC, Kaufman HE. Quantification of Real-Time Confocal Images of the Human Cornea. *J Neurosci Methods*. 1994 Oct;54(2):197-203.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986 Feb 8;1(8476):307-10.
- Blumcke S, Morgenroth K Jr. The stereo ultrastructure of the external and internal surface of the cornea. *J Ultrastruct Res*. 1967 Jun 18(5):502-18.
- Bochert R, Zhivov A, Kraak R, Stave J, Guthoff RF. Contribution to comprehension of image formation in confocal microscopy of córnea with Rostock córnea module. *Br J Ophthalmol*. 2005 Oct;89(10):1351-5.
- Bohnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. *Prog Ret Eye Res*. 1999 Sep;18(5):553-628.
- Bonini S, Rama P, Olzi D, Lambiase A. Neurotrophic keratitis. *Eye (Lond)* 2003 Nov;17(8):989-95.
- Bourne WM, Kaufman HE. Cataract extraxtion and the corneal endothelium. *Am J Ophthalmol*. 1976 Jul;82(1):44-47.
- Bourne WM. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea* 2001 Aug;20(6):560-9.
- Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye* 2003 Nov;17(8):912-8.
- Boyde A, Petran M. Light budgets, light and heavy losses: one or two-sided tandem scanning(real-time, direct-view, confocal) microscopy. *J Microsc*. 1990 160: 335-342.
- Boyde A. Stereoscopic images in confocal (tandem scanning) microscopy. *Science*. 1985 Dec 13;230(4731):1270-72.

- Boyde A, Jones SJ, Taylor ML, Wolfe LA, Watson TF. *J Microsc.* 1990 Jan;157(Pt1):39-49.
- Bozkurt B, Ozturk BT, Kerimoglu H, Irkec M, Pekel H. *In vivo* confocal microscopic findings of 2 patients with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. *Cornea.* 2010 May;29(5):590-3.
- Brasnu E, Bourcier T, Dupas B, Degorge S, Rodallec T, Laroche L, Borderie V, Baudouin C. *In vivo* confocal microscopy in fungal keratitis. *Br J Ophthalmol.* 2007 May;91(5):588-91
- Brasnu E, Dupas B, Hoang-Xuan T, Baudouin C, Gatinel D. Schnyder's crystalline-like corneal dystrophy: a case report. *J Fr Ophthalmol.* 2010 Apr;33(4):264.e1-5.
- British Standards Institution: Precision of Test Methods 1: Guide for the Determination and Reproducibility for a Standard Test Method (BS 597, Part 1). London, BSI, 1975.
- Brown SI, Dervichian DG. The oils of the meibomian glands. Physical and surface characteristics. *Arch Ophthalmol.* 1969 Oct;82(4):537-40
- Busted N, Olsen T, Schmitz O. Clinical observations on the corneal thickness and the corneal endothelium in diabetes mellitus. *Br J Ophthalmol.* 1981 Oct;65(10):687-90.
- Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, Shields W, Lemp MA. Confocal microscopy of the living eye. *CLAO J.* 1990 Jan-Mar;16(1):65-73.
- Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, McCulley JP, Jester JV. Clinical and diagnostic use of *in vivo* confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology.* 1993 Oct;100(10):1444-54.
- Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM, Jester JV. Specular microscopy, confocal microscopy and ultrasound biomicroscopy —Diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea.* 2000 Sep;19 (5):712-22.
- Cantani A, Giardini O, Ciarnella Cantani A. Nephropathic cystinosis: ineffectiveness of cysteamine therapy for ocular changes. *Am J Ophthalmol.* 1983 May;95(5):713-4.
- Chang PY, Carrel H, Huang JS, Wang IJ, Hou YC, Chen WL, Wang JY, Hu FR. Decreased density of corneal basal epithelium and subbasal corneal nerve bundle changes in patients with diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2006 Sep;142(3):488-90.
- Chen H, Yamabayashi S, Tanaka Y, Ohno S, Tsukahara S. Structure and composition of rat precorneal tear film a study by an in vitro cryofixation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997 Feb;38(2):381-7.
- Chen JY, Tseng SCG. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990 Jul;31(7):1301-14.
- Chen JY, Tseng SCG. Abnormal corneal epithelial wound healing in partial thickness removal of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991 Jul;32(8):2219-33.
- Chen WL, Shen Ep, Hsieh Yt, Yeh Pt, Wang Tj, Hu Fr. Comparison of *in vivo* confocal microscopic findings between epi-LASIK procedures with different management of the epithelial flaps. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Jun 1;52(6):3640.
- Chen WL, Lin CT, Ko PS, Yeh PT, Kuan YH, Hu FR, Yang CM. *In vivo* confocal microscopic findings of corneal wound healing after corneal epithelial debridement in diabetic vitrectomy. *Ophthalmology.* 2009 Jun;116(6):1038-47.
- Cheng HM, Gonzalez RG. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. *Metabolism* 1986 Apr;35(4 Suppl 1):10-4.
- Chiou AG, Kaufman SC, Beuerman RW, Ohta T, Soliman H, Kaufman HE. Confocal microscopy in cornea guttata and Fuchs' endothelial dystrophy. *Br J Ophthalmol.* 1999 Feb;83(2):185-9.
- Chiou AGY, Kaufman SC, Kaufman HE, Beuerman RW. Clinical corneal confocal microscopy. *Surv. Ophthalmol.* 2006 Sep-Oct;51(5):482-500.
- Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S233-6.
- Ciancaglini M, Carpineto P, Zuppardi E, Nubile M, Doronzo E, Mastropasqua L. *In vivo* confocal microscopy of patients with amiodarone-induced keratopathy. *Cornea.* 2001 May;20(4):368-73.
- Clark CM, Lee DA. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1995 May 4;332(18):1210-7.
- Clarke B, Sinha A, Parmar DN, Sykakis E. Advances in the Diagnosis and Treatment of Acanthamoeba Keratitis. *J Ophthalmol.* 2012;2012:484892.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Claerhout A; Goegebuer C, van den Broecke C, Kestelyn P. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2004 Aug;242(8):648-53.

Clover GM, Poole CA, Brookes NH. Confocal imaging of a gap junction protein associated with the keratocytes of the human cornea. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1996 24(2 Suppl):10-2.

Coelho D, Tavares R, Quadrado MJ, Murta JN. Confocal microscopy evaluation of prophylactic mitomycin C used to inhibit corneal haze after PRK. XXV ESCRS Stockholm. 2007 *Comunicação Oral*.

Corbett MC, Prydal JI, Verma S, Oliver KM, Pande M, Marshall J. An *in vivo* investigation of the structures responsible for corneal haze after photorefractive keratectomy and their effect on visual function. *Ophthalmology*. 1996 103(9):1366-1380.

Costa E, Quadrado MJ, Marques I, Murta JN. Microscopia Confocal no diagnóstico de Queratites Infecciosas. *Exp. Ophthalmol*. 2009 (35):77-83.

Costa E, Garrido I, Veríssimo J, Quadrado MJ, Proença R, Murta J. Avaliação da Microanatomia do Limbo. *Oftalmologia*. 2011 35(2):115-121.

Cotsarelis G, Cheng S, Dong G, Sun T, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989 Apr 21;57(2):201-9.

Cristovam PC, Glória MA, Melo GB, Gomes JA. Importância do co-cultivo com fibroblastos de camundongo 3T3 para estabelecer cultura de suspensão de células epiteliais do limbo humano. *Arq Bras Oftalmol*. 2008 Sep-Oct;71(5):689-94.

Croxatto JO, Tytiun AE, Argento CJ. Sequential *in vivo* confocal microscopy study of corneal wound healing after cross-linking in patients with keratoconus. *J Refract Surg*. 2010 Sep;26(9):638-45.

Cruzat A, Pavan-Langston D, Hamrah P. *In Vivo* Confocal Microscopy of Corneal Nerves: Analysis and Clinical Correlation. *Semin Ophthalmol*. 2010 Sep-Nov;25(5-6):171-7.

Cunha-Vaz JG, Shakib M, Ashton N. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *Br J Ophthalmol*. 1966a Aug;50(8):441-53.

Cunha-Vaz JG. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. II. Breakdown of the blood-retinal barrier by injury. *Br J Ophthalmol*. 1966b Aug;50(8):454-462.

Cunha-Vaz JG. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. 3. Breakdown of the blood-retinal barrier by circulatory disturbances. *Br J Ophthalmol*. 1966c Sep;50(9):505-16.

Cunha-Vaz JG, Faria de Abreu JR, Campos AJ. Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol*. 1975 Nov;59(11):649-56.

Czugala M, Karolak JA, Nowak DM, Polakowski P, Pitarque J, Molinari A, Rydzanicz M, Bejjani BA, Yue BY, Szaflik JP, Gajicka M. Novel mutation and three other sequence variants segregating with phenotype at keratoconus 13q32 susceptibility locus. *Eur J Hum Genet*. 2012 Apr;20(4):389-9 .

Dart JK, Saw VP, Kilvington S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol*. 2009 Oct;148(4):487-499.

Das S, Samant M, Garg P, Vaddavalli PK, Vemuganti GK. Role of confocal microscopy in deep fungal keratitis. *Cornea*. 2009 Jan; 28(1): 11-13.

Datiles MB, Kador PF, Kashima K, Kinoshita JH, Sinha A. The effects of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, on the corneal endothelium in galactosemic dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990 Nov;31(11):2201-4..

Davenger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*. 1971 Feb 19;229(5286):560-1.

Davies PD, Duncan G, Pynsent PB, Arber DL, Lucas VA. Aqueous humour glucose concentration in cataract patients and its effect on the lens. *Exp Eye Res*. 1984 Nov;39(5):605-9.

Daya SM, Ilari L. Living related conjunctival limbal allograft for the treatment of stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2001 Jan;108(1):126-33.

Daya SM, Watson A, Sharpe JR, Giledi O, Rowe A, Martin R, James SE. Outcomes and DNA analysis of *ex vivo* expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology*. 2005 Mar;112(3):470-7.

De Cillà S, Ranno S, Carini E, Fogagnolo P, Ceresara G, Orzalesi N, Rossetti LM. Corneal Subbasal Nerves Changes in Patients with Diabetic Retinopathy: An *In Vivo* Confocal Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Nov;50(11):5155-8.

- Deng S, Sejpal KD, Tang Q, Aldave AJ, Lee OL, Yu F. Characterization of Limbal Stem Cell Deficiency by In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy: A Microstructural Approach. *Arch Ophthalmol*. 2012 Apr;130(4):440-5.
- Dexl AK, Ruckhofer J, Riha W, Hohensinn M, Rueckl T, Messmer EM, Grabner G, Seyeddain OJ. Central and peripheral corneal iron deposits after implantation of a small-aperture corneal inlay for correction of presbyopia. *Refract Surg*. 2011 Dec;27(12):876-80.
- Diakonis VF, Pallikaris A, Kymionis GD, Markomanolakis MM. Alterations in endothelial cell density after photorefractive keratectomy with adjuvant mitomycin. *Am J Ophthalmol*. 2007 Jul;144(1):99-103.
- Dosso AA, Rungger-Brändle E. Clinical course of epidemic keratoconjunctivitis: evaluation by in vivo confocal microscopy. *Cornea*. 2008 Apr;27(3):263-8.
- Draaijer A, Hout PM. A standard video-rate confocal laser-scanning reflection and fluorescent microscope. *Scanning*. 1988 10:139–145.
- Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol*. 2000 Mar-Apr;44(5):415-25.
- Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol*. 2000 Jun;48(2):83-92.
- Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical Structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol*. 2005 May;89(5):529-32.
- Dua HS, Miri A, Said DG. Contemporary limbal stem cell transplantation – a review. *Clinical Experimental Ophthalmol*. 2010 Mar;38(2):104-17
- Duke-Elder, S., 1970, *System of Ophthal.*, alway, 5, 240 Henry Kimmpton, London.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs—an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. (5 Suppl.) *Ophthalmology*. 1991 98:786–806.
- Edelhauser HF & Ubels JL. (2002). Cornea and sclera. In Kaufman PL & Alm A. (Eds.), *Adler's physiology of the eye* (pp. 47- 117). Mosby.
- Edén U, Fagerholm P, Danyali R, Lagali N. Pathologic epithelial and anterior corneal nerve morphology in early-stage congenital aniridic keratopathy. *Ophthalmology*. 2012 Sep;119(9):1803-10
- Efron N, Morgan PB, Makrynioti D. Chronic Morbidity of Corneal Infiltrative Events Associated With Contact Lens Wear. *Cornea*. 2007 Aug;26(7):793-9.
- Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N. In vivo confocal microscopy of the bulbar conjunctiva. *Clinical Experimental Ophthalmol*. 2009 May;37(4):335-44.
- Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N. Confocal Microscopy of the Bulbar Conjunctiva in Contact Lens Wear. *Cornea*. 2010 Jan;29(1):43-52.
- Efron N. The Glenn A. Fry award lecture 2010: Ophthalmic markers of diabetic neuropathy. *Optom Vis Sci*. 2011 Jun;88(6):661-83.
- Ehlers N. Morphology and histochemistry of the corneal epithelium of mammals. *Acta Anat (Basel)*. 1970 75(2):161-98.
- Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Maguire LJ, Ramirez M, Bourne WM. Keratocyte density in vivo after photorefractive keratectomy in humans. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1999 97:221-36.
- Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Nau CB, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol*. 2002 Nov;134(5):689-95.
- Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in the human cornea after photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol*. 2003 Jun;121(6):770-6.
- Erie JC, McLaren JW, Patel SV. Confocal microscopy in ophthalmology. *Am J Ophthalmol*. 2009 Nov;148(5):639-46.
- Espana EM, Romano AC, Kawakita T, Di Pascuale M, Smiddy R, Tseng SC. Idiopathic limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2002 Nov;109(11):2004-10.
- Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, Solomon A, Tseng SC. Keratolimbic allograft in corneal reconstruction. *Eye*. 2004 18:406-417.
- Essepian JP, Rajpal R, O'Brien TP. Tandem Scanning Confocal Microscopic Analysis of Ciprofloxacin Corneal Deposits In-Vivo. *Cornea*. 1995 Jul;14(4):402-7.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Faria de Abreu JR, Campos AJ, Cunha-Vaz JG. Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol*. 1975 59(11):649-56.

Fatima A, Sangwan VS, Iftekhar G, Reddy P, Matalia H, Balasubramanian D, Vemuganti GK. Technique of cultivating limbal derived corneal epithelium on human amniotic membrane for clinical transplantation. *J Postgrad Med*. 2006 Oct-Dec;52(4):257-61.

Fatima A, Iftekhar G, Sangwan VS, Vemuganti GK. Ocular surface changes in limbal stem cell deficiency caused by chemical injury: a histologic study of excised pannus from recipients of cultured corneal epithelium. *Eye*. 2008 Sep;22(9):1161-7.

Fayol N, Labbé A, Dupont-Monod S, Dupas B, Baudouin C. Contribution of confocal microscopy and anterior chamber OCT to the study of corneal endothelial pathologies. *J Fr Ophthalmol*. 2007 Apr;30(4):348-56.

Feder RS, Kshetry P. Non-inflammatory ectatic disorders. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, (eds). *Cornea*. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby; 2005. pp. 955-974.

Feng Y & Simpson TL. Comparison of human central cornea and limbus in vivo using optical coherence tomography. *Optom Vis Science*. 2005 May;82(5):416-9.

Fine A, Durbin RM, McNaughton PA. Confocal microscopy: applications in neurobiology. *Trends Neurosci*. 1988 Aug;11(8):346-51.

Fogagnolo P, Sacchi M, Ceresara G, Paderni R, Lapadula P, Orzalesi N, Rossetti L. The Effects of Topical Coenzyme Q(10) and Vitamin E D-alpha-Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate after Cataract Surgery: A Clinical and in vivo Confocal Study. *Ophthalmologica*. 2013;229(1):26-31.

Fouls GN, Thoft RA, Perry HD, Tolentino FI. Factors related to corneal epithelial complications after closed vitrectomy in diabetics. *Arch Ophthalmol*. 1979 Jun;97(6):1076-8.

Freire M, Boyde A. Study of Golgi-impregnated material using the confocal tandem scanning reflected light microscope. *J Microsc*. 1990 May;158(Pt 2):285-90.

Frueh BE, Körner U, Böhnke M. Confocal microscopy of the cornea in patients with diabetes. *Klin Monbl Augenheilkd*. 1995 May;206(5):317-9.

Frueh BE, Böhnke M. In vivo confocal microscopy of fleck dystrophy. *Cornea*. 2003 Mar;22(2):160-3.

Fujishima H, Shimazaki J, Yagi Y, Tsubota K. Improvement of corneal sensation and tear dynamics in diabetic patients by oral aldose reductase inhibitor, ONO-2235: a preliminary study. *Cornea*. 1996 Jul;15(4):368-75.

Fullard RJ, Snyder C. Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990 Jun;31(6):1119-26.

Furrer P, Gurny R. Recent advances in confocal microscopy for studying drug delivery to the eye: concepts and pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010 Jan;74(1):33-40

Fung AT, Fraser-Bell S, Ojaimi E, Sutton G. In vivo confocal microscopy and polarizing microscopy of the cornea in a patient with nephropathic cystinosis. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2007 Apr;35(3):292-3..

Gahl WA, Reed GF, Thoene JG, Schulman JD, Rizzo WB, Jonas AJ, Denman DW, Schlesselman JJ, Corden BJ, Schneider JA. Cysteamine therapy for children with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med*. 1987 Apr 16;316(16):971-7.

Gahl WA, Kuehl EM, Iwata F, Lindblad A, Kaiser-Kupfer MI. Corneal crystals in nephropathic cystinosis: natural history and treatment with cysteamine eyedrops. *Mol Genet Metab*. 2000 Sep-Oct;71(1-2):100-20.

Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CR, et al, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, vol III. New York: McGraw Hill; 2001:5094-97.

Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med*. 2002 Jul 11;347(2):111-21.

García-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C. Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 1994 Nov;59(5):597-605.

Garg P, Gopinathan U, Choudhary K, Rao GN. Keratomycosis: clinical and microbiologic experience with dematiaceous fungi. *Ophthalmology*. 2000 Mar;107(3):574-80.

Gekka M, Miyata K, Nagai Y, Nemoto S, Sameshima T, Tanabe T, Maruoka S, Nakahara M, Kato S, Amano S. Corneal epithelial barrier function in diabetic patients. *Cornea*. 2004 Jan;23(1):35-7.

- Gharbiya M, Moramarco A, Castori M, Parisi F, Celletti C, Marengo M, Mariani I, Grammatico P, Camerota F. Ocular Features in Joint Hypermobility Syndrome/Ehlers-Danlos Syndrome Hypermobility Type: A Clinical and In Vivo Confocal Microscopy Study. *Am J Ophthalmol*. 2012 Sep;154(3):593-600.
- Gillette TE, Chandler JW, Greiner JV. Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmology*. 1982 Jun;89(6):700-11.
- Giraud JP, Pouliquen Y, Offret G, Payrau P. Statistical morphometric studies in normal human and rabbit corneal stroma. *Exp Eye Res*. 1975 Sep;21(3):221-9.
- Gipson IK. Anatomy of the conjunctiva, cornea, and limbus. In: Smolin G and Thoft RA, eds. *The Cornea*. Boston: Little, Brown and Company. 1994, pp 3-24.
- Gobbels M, Spitznas M, Oldendoerp J. Impairment of corneal epithelial barrier function in diabetics. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1989;227(2):142-4.
- Goodman GL, Trokel SL, Stark WJ, Munnerlyn CR, Green WR. Corneal healing following laser refractive keratectomy. *Arch Ophthalmol*. 1989 Dec;107(12):1799-803.
- Gopinathan U, Garg P, Fernandes M, Sharma S, Athmanathan S, Rao GN. The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis. A 10-year review at a referral eye care centre in south India. *Cornea*. 2002 Aug;21(6):555-9.
- Grupcheva CN, Ormonde SE, McGhee C. In vivo confocal microscopy of the cornea in nephropathic cystinosis. *Arch Ophthalmol*. 2002 Dec;120(12):1742-5.
- Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: The edge effect. *J Microsc*. 1977 111 (2):19-223.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988 May;96(5):379-94.
- Guthoff BR, Thaeer A. In-vivo real-time confocal microscopy of the human cornea. *Proc. SPIE* 1877,100 (1993)
- Guthoff BR, Baudouin C, Stave J. Confocal Laser Scanning in vivo Microscopy. In: Atlas of Confocal Laser Scanning in-Vivo Microscopy in Ophthalmology: Principles and Applications in Diagnostic and Therapeutic Ophthalmology [I.E. Ophthalmology]. Berlin: Springer, 2006, pp 31-148.
- Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo Confocal Microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2009 Jan;37(1):100-17.
- Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, Guthoff RF. The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*. 2000 Mar;19(2):185-93.
- Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, Prüss H, Zheng L, Shahatit BM, Bayhan HA, Dana R, Pavan-Langston D. Unilateral Herpes Zoster Ophthalmicus results in bilateral corneal nerve alteration. An in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology*. 2013 Jan;120(1):40-7.
- Han ES, Wee WR, Lee JH, Kim MK. The long-term safety of donor eye for 180 degrees limbal transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007 May;245(5):745-8.
- Hanna C, O'BRIEN JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol*. 1961 May;65:695-8.
- Hardarson T, Hanson C, Claesson M, Stenevi U. Time-lapse recordings of human corneal epithelial healing. *Acta Ophthalmol Scand*. 2004 Apr;82(2):184-8.
- Harrison DA, Joos C, Ambrosio R. Morphology of corneal basal epithelial cells by in vivo slit-scanning confocal microscopy. *Cornea*. 2003 Apr;22(3):246-8.
- Hatou S, Dogru M, Ibrahim OM, Wakamatsu T, Sato EA, Shimmura S, Negishi K, Tsubota K. The application of in vivo confocal scanning laser microscopy in the diagnosis and evaluation of treatment responses in Mooren's ulcer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Aug 24;52(9):6680-9.
- Hau SC, Tuft SJ. In vivo confocal microscopy of bleb-like disorder in epithelial basement membrane dystrophy. *Cornea*. 2011 Dec;30(12):1478-80
- Hayat M. Basic techniques for transmission electron microscopy. Orlando, FL: Academic Press; 1986. p. 411.
- He J, Bazan NG, Bazan HE. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp Eye Res*. 2010 Oct;91(4):513-23.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

- He J, Bazan HE. Mapping the Nerve Architecture of Diabetic Human Corneas. *Ophthalmology*. 2012 May;119(5):956-64
- Hecker LA, McLaren JW, Bachman LA, Patel SV. Anterior keratocyte depletion in fuchs endothelial dystrophy. *Arch Ophthalmol*. 2011 May;129(5):555-61.
- Hee MR, Izatt JA, Swanson EA, Huang D, Schuman JS, Lin CP. Optical coherence tomography of the human retina. *Arch Ophthalmol*. 1995 Mar;113(3):325-32.
- Hirst LW. The treatment of pterygium. *Surv Ophthalmol*. 2003 Mar-Apr;48(2):145-80.
- Hirsch M. Structure fine et fonctions de l'endothélium de la cornée. *J Fr Ophthalmol*. 1978 Jan;1(1):61-71.
- Hoefle FB, Maurice DM, Sibley RC. Human corneal donor material. A method of examination before keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 1970 Dec;84(6):741-4.
- Hogan M, Alvarado J, Weddel J. *Histology of the Human eye*, Philadelphia, w.b. Saunders. 1971; p 687.
- Holland EJ, Schwartz GS. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea*. 1996 Nov;15(6):549-56.
- Holland EJ, Schwartz GS. Epithelial stem-cell transplantation for severe ocular surface disease. *N Eng J Med*. 1999 Jun 3;340(22):1752-3.
- Hollingsworth J, Perez-Gomez I, Mutalib HA, Efron N. A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope. *Optom Vis Sci*. 2001 Oct;78(10):706-11.
- Holly FJ, Lemp MA. Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol*. 1977 Sep-Oct;22(2):69-87.
- Holopainen JM, Moilanen JA, Tervo TM. In vivo confocal microscopy of Fleck dystrophy and pre-Descemet's membrane corneal dystrophy. *Cornea*. 2003 Mar;22(2):160-3.
- Hong J, Zheng T, Xu J, Deng SX, Chen L, Sun X, Le Q, Li Y. Assessment of limbus and central cornea in patients with keratolimbal allograft transplantation using in vivo laser scanning confocal microscopy: an observational study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011 May;249(5):701-8.
- Hong J, Qian T, Le Q, Sun X, Wu J, Chen J, Yu X, Xu J. NGF promotes cell cycle progression by regulating D-type cyclins via PI3K/Akt and MAPK/Erk activation in human corneal epithelial cells. *Mol Vis*. 2012 18: 758-764.
- Hosotani H, Ohashi Y, Yamada M, et al. Reversal of abnormal corneal epithelial cell morphologic characteristics and reduced corneal sensitivity in diabetic patients by aldose reductase inhibitor, CT-112. *Am J Ophthalmol*. 1995 119:288-94.
- Hosotani H, Ohashi Y, Kinoshita S, Matsumoto T, Awata T. Effects of topical aldose reductase inhibitor CT-112 on corneal sensitivity of diabetic rats. *Curr Eye Res*. 1996 Oct;15(10):1005-7.
- Hovakimyan M, Guthoff RF, Stachs O. Collagen cross-linking: current status and future directions. *J Ophthalmol*. 2012;2012:406850.
- Hovakimyan M, Ramoth T, Löbner M, Schmitz KP, Witt M, Guthoff R, Stachs O. Evaluation of Protective Effects of Trehalose on Desiccation of Epithelial Cells in Three Dimensional Reconstructed Human Corneal Epithelium. *Curr Eye Res*. 2012 Nov;37(11):982-9.
- Hu Y, Matsumoto Y, Adan E, Dogru M, Fukagawa K, Tsubota K. Corneal in vivo confocal scanning laser microscopy in patients with atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology*. 2008 Nov;115(11):2004-12.
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Puliafito CA. Optical coherence tomography. *Science*. 1991 Nov 22;254(5035):1178-81.
- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006 Jun;29(6):1420-32.
- Hsu M, Tu E, Bouchard C. Confocal microscopy of contact lens keratitis presenting as central toxic keratopathy. *Eye Contact Lens*. 2011 Nov;37(6):377-80.
- Hsuan JD, Harding JJ, Bron AJ. The penetration of topical cysteamine into the human eye. *J Ocul Pharmacol Ther*. 1996 Winter;12(4):499-502.
- Huisingh C, McGwin G Jr. Keratocyte Density 3 Months, 15 Months, and 3 Years After Corneal Surface Ablation With Mitomycin C. *Am J Ophthalmol*. 2012 May;153(5):1007.

- Hume DA, Lovblom LE, Ahmed A, Yeung E, Orszag A, Shin TM, Bril V, Perkins BA. Higher magnification lenses versus conventional lenses for evaluation of diabetic neuropathy by corneal in vivo confocal microscopy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012 Aug;97(2):e37-40.
- Hyndiuk RA, Kazarian EL, Schultz RO, Seideman S. Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol.* 1977 Dec;95(12):2193-6.
- Imre L, Nagymihály A. Reliability and reproducibility of corneal endothelial image analysis by in vivo confocal microscopy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001 Jun;239(5):356-60.
- Infeld DA, O'Shea JG. Diabetic retinopathy. *Postgrad Med J.* 1998 Mar;74(869):129-33.
- Ismail MM. Correction of hyperopia with intracorneal implants. *J Cataract Refract Surg.* 2002 Mar;28(3):527-30
- Iwata F, Kaiser-Kupfer MI. Ocular manifestations of metabolic disorders. *Curr Opin Ophthalmol.* 1994 Dec;5(6):79-83.
- Iwata F, Kuehl EM, Reed GF, McCain LM, Gahl WA, Kaiser-Kupfer MI. A randomized clinical trial of topical cysteamine disulfide (cystamine) versus free thiol (cysteamine) in the treatment of corneal cystine crystals in cystinosis. *Mol Genet Metab.* 1998 Aug;64(4):237-42.
- Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney D F, M Coroneo. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol.* 2003 Feb; 87(2): 225–236.
- Javadi MA, Rezaei-Kanavi M, Javadi A; Naghshgar N. Meesmann Corneal Dystrophy; a Clinico-Pathologic, ultrastructural and confocal scan report. *J Ophthalmic Vis Res.* 2010 Apr;5(2):122-6.
- Jester JV, Petroll WM, Garana RM, Lemp MA, Cavanagh HD. Comparison of in vivo and ex vivo cellular structure in rabbit eyes detected by tandem scanning microscopy. *J Microsc.* 1992 Jan;165(Pt 1):169-81.
- Jhonson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol.* 1982 Dec;100(12):1942-7
- Jing Y, Wang L. Morphological evaluation of Schnyder's crystalline corneal dystrophy by laser scanning confocal microscopy and Fourier-domain optical coherence tomography. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2009 Apr;37(3):308-12.
- Jones NP, Postlethwaite RJ, Noble JL. Clearance of corneal crystals in nephropathic cystinosis by topical cysteamine 0.5%. *Br J Ophthalmol.* 1991 May;75(5):311-2.
- Kabosova A, Kramerov AA, Aoki AM, Murphy G, Zieske JD, Ljubimov AV. Human diabetic corneas preserve wound healing, basement membrane, integrin and MMP-10 differences from normal corneas in organ culture. *Exp Eye Res.* 2003 Aug;77(2):211-7.
- Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, Jones JC, Kenney MC, Koch M, Ninomiya Y, Patton BL, Paulsson M, Sado Y, Sage EH, Sasaki T, Sorokin LM, Steiner-Champlaud MF, Sun TT, Sundarraj N, Timpl R, Virtanen I, Ljubimov AV. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Nov;48(11):4989-99.
- Kaiser-Kupfer MI, Fujikawa L, Kuwabara T, Jain S, Gahl WA. Removal of corneal crystals by topical cysteamine in nephropathic cystinosis. *N Engl J Med.* 1987 Mar 26;316(13):775-9.
- Kaji Y, Usui T, Oshika T, Amano S. Advanced glycation end products in diabetic corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Feb;41(2):362-8.
- Kaiserman I, Bahar I, McAllum P, Srinivasan S, Elbaz U, Slomovic AR, Rootman DS. Prognostic factors in Acanthamoeba keratitis. *Can J Ophthalmol.* 2012 Jun;47(3):312-7.
- Kaji Y. Prevention of diabetic keratopathy. *Br J Ophthalmol.* 2005 Mar;89(3):254-5.
- Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, Boulton AJ, Efron N, Malik RA. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Feb;45(2):418-22.
- Kardon RH. Anatomy. In: Tripathi RC, ed. Fundamentals and principles of ophthalmology, Section 2. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 1995–1996:49–54.
- Karimi A-H, Wong A, Bizheva K. Automated detection and cell density assessment of keratocytes in the human corneal stroma from ultrahigh resolution optical coherence tomograms. *Biomed Opt Express.* 2011 Oct 1;2(10):2905-16.
- Katz M: The human eye as an optical system. In Tasman W and Jaeger EA, editors: Duane's clinical ophthalmology, vol 1, Philadelphia, 1989, JB Lippincott Co.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

- Kaufman HE. The human corneal endothelium. *Am J Ophthalmol*. 1966 61(5):835-41.
- Kaufman SC, Beuerman RW, Kaufman HE. Diagnosis of advanced Fuchs' endothelial dystrophy with the confocal microscope. *Am J Ophthalmol*. 1993 Nov 15;116(5):652-3.
- Kaufman SC; Beuerman RW, Goldberg D. A new form of primary, localized, corneal amyloidosis: a case report with confocal microscopy. *Metab Pediatric Syst Ophthalmol*. 1995 18(1-4):1-4.
- Kaufman SC, Musch DC, Belin MW, Cohen EJ, Meisler DM, Reinhart WJ, Udell IJ, Van Meter WS. Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 2004 Feb;111(2): 396-406.
- Kanavi MR, Javadi M, Yazdani S, Mirdehghanm S. Sensitivity and specificity of confocal scan in the diagnosis of infectious keratitis. *Cornea*. 2007 Aug;26(7):782-6.
- Kawamoto K, Chikama T, Takahashi N, Nishida T. In vivo observation of Langerhans cells by laser confocal microscopy in Thygeson's superficial punctate keratitis. *Mol Vis*. 2009 Jul 29;15:1456-62.
- Kaya V, Utine CA, Yilmaz OF. Efficacy of corneal collagen cross-linking using a custom epithelial debridement technique in thin corneas: a confocal microscopy study. *J Refract Surg*. 2011 Jun;27(6):444-50.
- Kenyon KR, Wafai Z, Michels R, Conway B, Tolentino F. Corneal basement membrane abnormalities in diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17(suppl):245.
- Khan A, Latimer B. Successful Use of Topical Cysteamine Formulated From the Oral Preparation in a Child With Keratopathy Secondary to Cystinosis. *Am J Ophthalmol*. 2004;138:674-675.
- Kim EC, Kim DJ, Lee SS, Kim MS. Ultrastructural changes of cornea after ethanol ingestion in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) and Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010 Oct;248(10):1457-66.
- King-Smith PE, Fink B, Fogt N. Three interferometric methods for measuring the thickness of layers of the tear film. *Optom Vis Sci*. 1999 Jan;76(1):19-32.
- Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P, Merola LO. Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism*. 1979 Apr;28(4 Suppl 1):462-9.
- Kinoshita JH, Nishimura C. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metab Rev*. 1988 Jun;4(4):323-37.
- Klyce S, Beuerman R. Structure and function of the cornea. In: Kaufman H., *The Cornea*, Churchill Livingstone, New York, 1998; 3-50.
- Knappe S, Stave J, Guthoff RF. Epidemic keratoconjunctivitis. In vivo images of corneal structures with the confocal Rostocker laser scanning microscope (RLSM). *Ophthalmologe*. 2005 Aug;102(8):798-801.
- Knappe S, Stachs O, Zhivov A, Hovakimyan M, Guthoff R. Results of confocal microscopy examinations after collagen cross-linking with riboflavin and UVA light in patients with progressive keratoconus. *Ophthalmologica*. 2011 225(2):95-104.
- Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy findings of Thygeson superficial punctate keratitis. *Cornea*. 2011 Jun;30(6):675-80.
- Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy findings in patients with map-dot-fingerprint (epithelial basement membrane) dystrophy. *Cin Ophthalmol*. 2012a 6:1187-90.
- Kobayashi A, Yokogawa H, Higashide T, Nitta K, Sugiyama K. Clinical significance of owl eye morphologic features by in vivo laser confocal microscopy in patients with cytomegalovirus corneal endotheliitis. *Am J Ophthalmol*. 2012b Mar;153(3):445-53
- Kocabora MS, Ozbilen KT, Altunsoy M, Ahishali B, Taskapili M. Clinicopathological features of ocular cystinosis. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2008 Nov;36(8):778-81.
- Koester CJ. Scanning mirror microscope with optical sectioning characteristics: applications to ophthalmology. *Appl Opt*. 1980 Jun 1;19(11):1749-57.
- Koester CJ, Auran JD, Rosskothén HD, Florakis GJ, Tackaberry RB. Clinical microscopy of the cornea utilizing optical sectioning and a high-numerical-aperture objective. *J Opt Soc Am A*. 1993 Jul;10(7):1670-9.
- Ku JY, Grupcheva CN, McGhee CN. Microstructural analysis of Salzmann's nodular degeneration by in vivo confocal microscopy. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2002 Oct;30(5):367-8.

- Kumar RL, Cruzat A, Hamrah P. Current state of in vivo confocal microscopy in management of microbial keratitis. *Semin Ophthalmol*. 2010 Sep-Nov;25(5-6):166-70.
- Kurbanyan K, Hoesl LM, Schrems WA, Hamrah P. Corneal nerve alterations in acute Acanthamoeba and fungal keratitis: an in vivo confocal microscopy study. *Eye (Lond)*. 2012 Jan;26(1):126-32.
- Kurbanyan K, Sejpal KD, Aldave AJ, Deng SX. In Vivo Confocal Microscopic Findings in Lisch Corneal Dystrophy. *Cornea*. 2012 Apr;31(4):437-41.
- Kuwabara T. Fine structure of the eye. ed 2, Boston: Harvard University Medical School. 1970:4
- Kymionis GD, Tsiklis NS, Pallikaris AI, Kounis G, Diakonis VF, Astyrakakis N, Siganos CS. Long-term follow-up of Intacs for post-LASIK corneal ectasia. *Ophthalmology*. 2006 Nov;113(11):1909-17.
- Kymionis GD, Diakonis VF, Bouzoukis DI, Lampropoulou I, Pallikaris AI. Idiopathic recurrence of diffuse lamellar keratitis after LASIK. *J Refract Surg*. 2007 Sep;23(7):720-1.
- Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, Kontadakis GA, Krasia MS, Papadiamantis AG, Coskunseven E, Pallikaris AI. Posterior linear stromal haze formation after simultaneous photorefractive keratectomy followed by corneal collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Oct;51(10):5030-3
- Labbé A, Niaudet P, Loirat C, Charbit M, Guest G, Baudouin C. In vivo confocal microscopy and anterior segment optical coherence tomography analysis of the cornea in nephropathic cystinosis. *Ophthalmology*. 2009 May;116(5):870-6.
- Labbé A, Gabison E, Cochereau I, Baudouin C. Diagnosis of fungal keratitis by in vivo confocal microscopy: a case report. *Eye*. 2011 Jul;25(7):956-8.
- Labbé A, Alalwani H, Van Went C, Brasnu E, Georgescu D, Baudouin C. The relationship between subbasal nerve morphology and corneal sensation in ocular surface disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Jul 24;53(8):4926-31.
- Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*. 1975 Feb;93(2):143-5. 1975.
- Laird JA, Beuerman RW, Kaufman SC. Quantification of confocal images of human corneal endothelium. Proceedings of Ophthalmic Technologies VI, Proceedings vol 2673, Pascal O. Rol, Editors 1996 pp 224-27.
- Lambiase A, Rama P, Bomini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med*. 1998 Apr 23;338(17):1174-80.
- Laule A, Cable MK, Hoffman CE, Hanna C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol*. 1978 Nov;96(11):2031-5.
- Lavker RM, Tseng CS, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res*. 2004 Mar;78(3):433-46.
- Lee JS, Oum BS, Choi HY, Lee JE, Cho BM. Differences in corneal thickness and corneal endothelium related to duration in diabetes. *Eye*. 2006 Mar;20(3):315-8
- Le QH, Wang WT, Hong JX, Sun XH, Zheng TY, Zhu WQ, Xu JJ. An in vivo confocal microscopy and impression cytology analysis of goblet cells in patients with chemical burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Mar;51(3):1397-400.
- Lemp MA, Dilly Pn, Boyde A. Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea. *Cornea*. 1985-1986;4(4):205-9.
- Leung DY, Yeung EF, Law RW, Young AL, Lam DS. In vivo confocal microscopy of epithelial inclusions from aberrant wound healing after astigmatic keratotomy. *Cornea*. 2004 Apr;23(3):299-301.
- Li HF, Petroll WM, Møller-Pedersen T, Maurer JK, Cavanagh HD, Jester JV. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr Eye Res*. 1997 Mar;16(3):214-21.
- Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* 2007 Jan;17(1):26-36.
- Liang L, Sheha H, Li J, Tseng SC. Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. *Eye* 2009 Oct;23(10):1946-53..
- Linna T, Tervo T. Real-time confocal microscopic observations on human corneal nerves and wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res*. 1997 Jul;16(7):640-9.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Lindsey SS, McCulley JP, Cavanagh HD, Verity SM, Bowman RW, Petroll WM. Prospective evaluation of PermaVision intracorneal implants using in vivo confocal microscopy. *J Refract Surg*. 2007 Apr;23(4):410-3.

Liu J, Sheha H, Fu Y, Giegengack M, Tseng SC. Oral mucosal graft with amniotic membrane transplantation for total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol*. 2011 Nov;152(5):739-47.

Ljubimov AV, Huang ZS, Huang GH, Burgeson RE, Gullberg D, Miner JH, Ninomiya Y, Sado Y, Kenney MC. Human corneal epithelial basement membrane and integrin alterations in diabetes and diabetic retinopathy. *J Histochem Cytochem*. 1998 Sep;46(9):1033-41.

Lobato L, Rocha A. Transthyretin amyloidosis and the kidney. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Aug;7(8):1337-46.

Lockwood A, Hope-Ross M, Chell P. Neurotrophic keratopathy and diabetes mellitus. *Eye*. 2006 Jul;20(7):837-9.

Ly LT, McCulley JP, Verity SM, Cavanagh HD, Bowman RW, Petroll WM. Evaluation of intrastromal lipid deposits after intacs implantation using in vivo confocal microscopy. *Eye Contact Lens*. 2006 Jul;32(4):211-5.

Ma X, He L, He D, Xu J. Chloroquine keratopathy of rheumatoid arthritis patients detected by in vivo confocal microscopy. *Curr Eye Res*. 2012 Apr;37(4):293-9.

Maldonado MJ, Ruiz-Oblitas L, Munuera JM, Aliseda D, Garcia-Layana A & Moreno-Montanes J. Optical coherence tomography evaluation of the corneal cap and stromal bed features after laser in situ keratomileusis for high myopia and astigmatism. *Ophthalmology*. 2000 Jan;107(1):81-7.

Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA, van Schie CH, Morgan P, Efron N, Boulton AJ. Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia*. 2003 May;46(5):683-8.

Mariappan I, Maddileti S, Savy S, Tiwari S, Gaddipati S, Fatima A, Sangwan VS, Balasubramanian D, Vemuganti GK. In vitro culture and expansion of human limbal epithelial cells. *Nat Protoc*. 2010 Aug;5(8):1470-9.

Marfurt CF, Cox J, Deek, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res*. 2010 Apr;90(4):478-92.

Marques JP, Beselga D, Oliveira R, Costa E, Rosa A, Quadrado MJ, Murta JN. Queratite por acanthamoeba: dificuldades no tratamento. CL139, SPO 2012 - 55º Congresso Português de Oftalmologia. 2012 *Comunicação Oral*

Marshall J, Trokel SL, Rothery S, Krueger RR. Long-term healing of the central cornea after photorefractive keratectomy using an excimer laser. *Ophthalmology*. 1988 Oct;95(10):1411-21.

Masters BR, Thaeer A. Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. *Applied Optics*. 1994 33(4):695-701.

Masters BR, Thaeer AA. In vivo real-time confocal microscopy of wing cells in the human cornea: a new benchmark for in vivo corneal microscopy. *Bioimages*. 1995 3:7-11.

Masters BR, Bohnke M. Confocal microscopy of the human cornea *in vivo*. *Int. Ophthalmol*. 2001 23:199-206

Matsuda M, Awata T, Ohashi Y, et al. The effects of aldose reductase inhibitor on the corneal endothelial morphology in diabetic rats. *Curr Eye Res*. 1987 6:391-7.

Matsuda M, Ohguro N, Ishimoto I, Fukuda M. Relationship of corneal endothelial morphology to diabetic retinopathy, duration of diabetes and glycemic control. *Jpn J Ophthalmol* 1990 34:53-6.

Mauger TF, Kuennen RA, Smith RH, Sawyer W. Acanthamoeba and Stenotrophomonas maltophilia keratitis with fungal keratitis in the contralateral eye. *Clin Ophthalmol*. 2010 Oct 21;4:1207-9.

Maurice DM. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia*. 1968 Nov 15;24(11):1094-5.

Maurice D. The cornea and sclera. 3 ed. *The Eye*, eded. H Davison. Vol. 1B. 1984, Orlando: Academic Press.

Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi T, Tommasi C, Caporossi A. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen - ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph *in vivo* confocal microscopy in humans. *Cornea*. 2007 May;26(4):390-7.

Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi O, Bovone C, Sparano MC, Balesytazzi A, Caporossi A. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modifications. *Am J Ophthalmol*. 2008 Oct;146(4):527-33.

McDermott AM, Xiao TL, Kern TS, Murphy CJ. Non-enzymatic glycation in corneas from normal and diabetic donors and its effects on epithelial cell attachment in vitro. *Optometry*. 2003 Jul;74(7):443-52.

- McLaren JW, Nau CB, Kitzmann AS, Bourne WM. Keratocyte density: comparison of two confocal microscopes. *Eye Contact Lens*. 2005 Jan;31(1):28-33.
- McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Automated Assessment of Keratocyte Density in Stromal Images from the ConfoScan 4 Confocal Microscope. *Invest Ophthalmol Visual Sci*. 2010 Apr;51(4):1918-26.
- McMenamin PG, Steele C, McGhee CNJ. Cornea anatomy, physiology and healing. *En excimer lasers in Ophthalmology*. Editor Charles McGhee (Martin Dunitz. Londres 1997) 41-63.
- McNamara NA, Brand RJ, Polse KA, Bourne WM. Corneal function during normal and high serum glucose levels in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 Jan;39(1):3-17.
- Melo GB, Gomes JAP, Glória MA, Martins MC, Haapalainen EF. Avaliação morfológica de diferentes técnicas de desepitelização da membrana amniótica humana. *Arq Bras Oftalmol*. 2007 May-Jun;70(3):407-11.
- Meller D, Augustin AJ, Koch FH. A modified technique of impression cytology to study the fine structure of corneal epithelium. *Ophthalmic Res*. 1996;28(2):71-9.
- Mendrinós E, Dosso A, Sommerhalder J, Shaarawy T. Coupling of HRT II and AS-OCT to evaluate corneal endothelial cell loss and in vivo visualization of the Ahmed glaucoma valve implant. *Eye (Lond)* 2009 Sep;23(9):1836-44.
- Messmer EM, Schmid-Tannwald C, Zapp D, Kampik A. In vivo confocal microscopy of corneal small fiber damage in diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010 Sep;248(9):1307-12.
- Meyer LA, Ubels JL, Edelhauser HF. Corneal endothelial morphology in the rat. Effects of aging, diabetes, and topical aldose reductase inhibitor treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988 Jun;29(6):940-8.
- Midena E, Brugin E, Ghirlando A, Sommovilla M, Avogaro A. Corneal diabetic neuropathy: A confocal microscopy study. *J Refract Surg*. 2006 Nov;22(9 Suppl):S1047-52.
- Midena E, Gambato C, Miotto S, Cortese M, Salvi R, Ghirlando A. Long-term effects on corneal keratocytes of mitomycin C during photorefractive keratectomy: a randomized contralateral eye confocal microscopy study. *J Refract Surg*. 2007 Nov;23(9 Suppl):S1011-4.
- Midena E, Cortese M, Miotto S, Gambato C, Cavarzeran C, Ghirlando A. Confocal microscopy of corneal sub-basal nerve plexus: a quantitative and qualitative analysis in healthy and pathological eyes. *J Refract Surg*. 2009 Jan;25(1 Suppl):S125-30.
- Miller, S.: Parson's diseases of the eye, New York, Churchill Livingstone, 1990.
- Minsky M. Microscopy apparatus; US Patent 301467 1961.
- Miri A, Al-Aqaba M, Otri AM, Fares U, Said DG, Faraj LA, Dua HS. In vivo confocal microscopic features of normal limbos. *Br J Ophthalmol*. 2012 Apr;96(4):530-6.
- Mishima S, Gasset A, Klyce SD, Baum JL. Determination of tear volume and tear flow. *Invest Ophthalmol*. 1966 5:264-276.
- Mitooka K, Ramirez M, Maguire LJ, Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density of central human corneas after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol*. 2002 103:307-314.
- Mocan MC, Durukan I, Irkec M, Orhan M. Morphologic alterations of both the stromal and subbasal nerves in the corneas of patients with diabetes. *Cornea*. 2006 Aug;25(7):769-73.
- Mocan MC, Irkec M, Mikropoulos DG, Bozkurt B, Orhan M, Konstas AG. In vivo confocal microscopic evaluation of the inflammatory response in non-epithelial herpes simplex keratitis. *Curr Eye Res*. 2012 Dec;37(12):1099-106.
- Moilanen JA, Holopainen JM, Vesaluoma MH, Tervo TM. Corneal recovery after lasik for high myopia: a 2-year prospective confocal microscopic study. *Br J Ophthalmol*. 2008 Oct;92(10):1397-402.
- Moller-Pedersen T, Vogel M, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Quantification of stromal thinning, epithelial thickness, and corneal haze after photorefractive keratectomy using in vivo confocal microscopy. *Ophthalmology*. 1997 Mar;104(3):360-8.
- Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. *Cornea*. 1998a 17:627-639.
- Moller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998b 39(3):487-501.
- Monaco G, Cacioppo V, Consonni D, Troiano P. Effects of osmoprotection on symptoms, ocular surface damage, and tear film modifications caused by glaucoma therapy. *Eur J Ophthalmol*. 2011 May-Jun;21(3):243-50.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Monnier VM, Sell DR, Genuth S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. *Ann NY Acad Sci*. 2005 1043:567-81.

Morishige WM, Boettcher K, Barry P, Cavanagh HD, Jester JV. Quantitative assessment of anteroposterior keratocyte density in the normal rabbit cornea. *Cornea*. 1995 14(1):3-9.

Morishige N, Komatsubara T, Chikama T, Nishida T. Direct observation of corneal nerve fibres in neurotrophic keratopathy by confocal biomicroscopy. *Lancet*. 1999 Nov 6;354(9190):1613-4.

Morishige N, Chijama TI, Sssa Y, Nishida T. Abnormal light scattering detected by confocal biomicroscopy at the corneal epithelial basement membrane of subjects with type II diabetes. *Diabetologia*. 2001 Mar;44(3):340-5.

Morishige N, Chikama TI, Yamada N, Tajkahaschi N, Morita T, Sonoda KH. Effect of preoperative duration of stromal edema in bullous keratopathy on early visual acuity after endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg*. 2012 Feb;38(2):303-8.

Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995 Dec;36(13):2557-67.

Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Ultrastructure of Human Cornea Nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996 37:476-488.

Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp. Eye Res*. 2003 May;76(5):521-42

Mungan N, Nischal KK, Héon E, MacKeen L, Balfe JW, Levin AV. Ultrasound biomicroscopy of the eye in cystinosis. *Arch Ophthalmol*. 2000 Oct;118(10):1329-33..

Murta JN, Quadrado MJ, Fonseca P, Faria R. Limbal conjunctival autograft transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygium. *Investigative Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:ARVO E-Abstract 4868. S:213

Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea* 1998a Sep;17(5):485-92.

Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. In vivo confocal microscopy of Fuchs' endothelial dystrophy. *Cornea* 1998b Sep;17(5):493-503.

Nakano E, Oliveira M, Portelinha W, Freitas D, Nakano K. Confocal microscopy in early diagnosis of *acanthamoeba* keratitis. *J Refract Surg*. 2004 Sep-Oct;20(5 Suppl): S737-40.

Nabavi Nouri M, Ahmed A, Bril V, Orszag A, Ng E, Nwe P, Perkins BA. Diabetic Neuropathy and Axon Reflex-Mediated Neurogenic Vasodilatation in Type 1 Diabetes. *PLoS ONE* 2012;7(4):e34807.

Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Jul;49(7):2964-70.

Nieto-Bona A, Lorente-Velázquez A, Collar CV, Nieto-Bona P, Mesa AG. Intraocular Straylight and Corneal Morphology Six Months after LASIK. *Curr Eye Res*. 2010 Mar;35(3):212-9.

Nieto-Bona A, González-Mesa A, Nieto-Bona MP, Villa-Collar C, Lorente-Velázquez A.. Short-term Effects of Overnight Orthokeratology on Corneal Cell Morphology and Corneal Thickness. *Cornea*. 2011 Jun;30(6):646-54.

Nischida T, Saika S. Cornea and Sclera: Anatomy and Physiology. In: Cornea. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Eds. St. Louis: Mosby, 2011, pp. 3-24.

Nitoda E, Kallinikos P, Pallikaris A, Moschandrea J, Amoiridis G, Ganotakis ES, Tsilimbaris M. Correlation of Diabetic Retinopathy and Corneal Neuropathy Using Confocal Microscopy. *Current Eye Research*. 2012 37,10:898-906.

Nghiem-Buffet MH, Gatinel D, Jacquot F, Chaîne G, Hoang-Xuan T. Limbal stem cell deficiency following phototherapeutic keratectomy. *Cornea* 2003 Jul;22(5):482-84.

Nguyen P, Yiu SC. Ocular surface reconstruction: recent innovations, surgical candidate selection and postoperative management. *Expert Rev Ophthalmol* 2008 3:567-84

Nubile M, Mastropasqua I. In vivo Confocal microscopy of the ocular surface: where are we now? *Br J ophthalmol*. 2009 93:850-852.

Ohguro N, Matsuda M, Ohashi Y, Fukuda M. Topical aldose reductase inhibitor for correcting corneal endothelial changes in diabetic patients. *Br J Ophthalmol*. 1995 79:1074-7.

Oh JY, Ko JH, Lee HJ, Kim MK, Lee JH, Wee WR. The antigenicity of ex vivo cultivated human corneal limbal epithelial and stromal cells: temporal changes in vitro. *Cornea* 2010 Nov;29(11):1302-7.

- Oliveira-Soto, Efron N. Morphology of Corneal Nerves Using Confocal Microscopy. *Cornea* 2001 May;20(4):374-84.
- Olsen T, Busted N. Corneal thickness in eyes with diabetic and nondiabetic neovascularisation. *Br J Ophthalmol*. 1981 October; 65(10): 691-93.
- O'Sullivan F, Clynes M. Limbal stem cells, a review of their identification and culture for clinical use. *Cytotechnology* 2007 53:101-106.
- Paladini I, Pieretti G, Giuntoli M, Abbruzzese G, Menchini U, Mencucci R. Crystalline corneal deposits in monoclonal gammopathy: in-vivo confocal microscopy. *Semin Ophthalmol*. 2013 Jan;28(1):37-40.
- Parmar DN, Awwad ST, Petroll WM, Bowman RW, McCulley JP, Cavanagh HD. Tandem scanning confocal corneal microscopy in the diagnosis of suspected *acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology* 2006 Apr; 113(4): 538-47.
- Parrozzani R, Lazzarini D, Alemany-Rubio E, Urban F, Midena E. Topical 1% 5-fluorouracil in ocular surface squamous neoplasia: a long-term safety study. *Br J Ophthalmol*. 2011 Mar;95(3):355-9.
- Patel DA, Chang SH, Harocopos GJ, Vora SC, Thang DH, Huang AJ. Granular and lattice deposits in corneal dystrophy caused by R124C mutation of TGFBIp. *Cornea*. 2010 Nov;29(11):1215-22
- Patel DV, McGhee CNJ. Mapping of the Normal Human Corneal Sub-Basal Nerve Plexus by In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 46, nº 12:4485-88.
- Patel DV, Sherwin T, McGhee CNJ. Laser scanning in vivo confocal microscopy of the normal human corneoscleral limbus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 47:2823-26.
- Patel DV, McGhee CNJ. Contemporary *in vivo* confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clin Exp Ophthalmol*. 2007 35:71-88.
- Patel DV, McGhee CN. In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery: a review. *Br J Ophthalmol*. 2009 Jul;93(7):853-60.
- Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, Nelson LR, Bourne WM. Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 40:320-326.
- Patel SV, McLaren JW, Hodge DO et al. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurements by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 42:333-39.
- Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne Wn. Confocal microscopy in vivo in corneas of long-term contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 43(4):995-1003.
- Patel SV, McLaren JW, Kittleson Km, Bourne WM. Subbasal nerve density and corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis: femtosecond laser vs mechanical microkeratome. *Arch Ophthalmol*. 2010 Nov;128(11):1413-9.
- Pauklin M, Fuchsluger TA, Westekemper H, Steuhl KP, Meller D. Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency. *Dev Ophthalmol*. 2010 45:57-70.
- Pawley J. Limitations on optical sectioning on live-cell confocal microscopy. *Scanning*. 2002 24:241-246.
- Pellegrini G, Traverso CE. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997 349:990-93.
- Pellistri I, Mora P, Ponzin D, Coggiola A, Nubile M, Orsoni JG. Cogan syndrome: confocal microscopy assessment of corneal damage. *Eur J Ophthalmol*. 2010 May-Jun;20(3):504-8.
- Pereira H, Almeida M, Cruz M, Marques I, Quadrado MJ, Murta J. Avaliação da zona dadora, após realização de transplante autólogo de limbo e conjuntiva no tratamento de pterígio primário e recorrente. *Oftalmologia* 2011 Vol 35, nº3, 259-268.
- Petran MH, Egger MD, Galambos R. Tandem scanning reflected light microscope. *J Optics Soc Am* 1968: 58(5) 661-664.
- Petran MH, Boyde A. The tandem scanning reflected Light Microscope. *Scanning*. 1985 (7):97-108.
- Petran MH, Boyde A. The tandem scanning reflected light microscope. *Scanning*. 1998 Mar;20(2):74-82.
- Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD. Quantitative three-dimensional confocal imaging of the cornea in situ and in vivo: system design and calibration. *Scanning*. 1996 Jan;18(1):45-9.
- Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Assessment of stress fiber orientation during healing of radial keratotomy wounds using confocal microscopy. *Scanning*. 1998 Mar;20(2):74-82.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Pfister RR. The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol*. 1973 Sep;12(9):654-68.

Pierro L, Brancato R, Zaganelli E. Correlation of corneal thickness with blood glucose control in diabetes mellitus. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1993 Apr;71(2):169-72.

Pisella PJ, Auzeir O, Bokobza Y, Debbasch C, Baudouin C. Evaluation of corneal stromal changes in vivo after laser in situ keratomileusis with confocal microscopy. *Ophthalmology*. 2001 Oct;108(10):1744-50.

Polunin GS, Kourenkov VV, Polunina EG. Corneal transparency and measurement of corneal permeability in excimer laser photorefractive keratectomy. *J Refract Surg*. 1998; Apr;14(2 Suppl):S230-4.

Popper M, Quadrado MJ, Morgado AM, Murta J, VanBest JA. The Use of Confocal Microscopy for evaluation of cell densities in diabetic patients. *Ophthalmic Res*. Vol. 35, Suppl. 1, 2003

Popper M, Morgado AM, Quadrado MJ, Van Best JA. Corneal cell density measurement *in vivo* by scanning slit confocal microscopy: Method and validation. *Ophthalmic Res*. 2004 36:270–276.

Popper M, Quadrado MJ, Morgado AM, Murta JN, Van Best JA, Muller LJ. Subbasal nerves and highly reflective cells in corneas of diabetic patients: In vivo evaluation by confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis. Sci*. 2005; 46: ARVO E- Abstract 879.

Pouliquen Y. Cornea. Anathomophysiologie, Paris, Masson, 1984 187-190.

Pritchard N, Edwards K, Shahidi AM, Sampson GP, Russell AW, Malik RA, Efron N. Corneal markers of diabetic neuropathy. *Ocul Surf*. 2011 Jan;9(1):17-28.

Priya CG, Arpitha P, Vaishali S, Prajna NV, Usha K, Sheetal K, Muthukkaruppan V. Adult human buccal epithelial stem cells: identification, ex-vivo expansion, and transplantation for corneal surface reconstruction. *Eye (Lond)*. 2011 Dec;25(12):1641-9.

Prydal JI, Campbell FW. Study of precorneal tear film thickness and structure by interferometry and confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992 May;33(6):1996-2005.

Prydal JI, Franc F, Dilly PN, Kerr Muir MG, Corbett MC, Marshall J. Keratocyte density and size in conscious humans by digital image analysis of confocal images. *Eye (Lond)*. 1998 12:337-42.

Puangricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 1995 102:1476-85.

Quadrado MJ, Van Best JA, Morgado M, Popper M, Murta JN, Cunha-Vaz J. Densidade das células da córnea em doentes diabéticos e normais utilizando microscopia confocal in vivo. *Oftalmologia*, XXV, 2001 25(4) 2001. *Comunicação oral*

Quadrado MJ, Morgado M, Popper M, Murta JN, Van Best JA. Densidade celular nas diferentes camadas corneanas através da microscopia Confocal. *Oftalmologia*, XXVI, 2002a 26(4):94. *Comunicação oral*.

Quadrado MJ, Popper M, Murta JN, Van Best JA: Microscopia Confocal no queratocone e após implante de anéis intraestromais. *Oftalmologia*, XXVI, 2002b 26(4):97. *Comunicação oral*.

Quadrado MJ, Popper M, Morgado AM, Murta JN, Van Best JA. Confocal Microscopy in vivo: Morphologic changes in keratoconus. *Exp. Ophthalmol*. 2004 30: 21-26.

Quadrado MJ, Popper M, Morgado AM, Murta JN, Van Best JA, Muller LJ. Highly reflective cells in the corneal stroma visualized by in vivo confocal microscopy. *Investigative Ophthalmol Vis Sci* 2005 46:ARVO E-Abstract 2194.

Quadrado MJ. Avaliação das alterações celulares *in vivo* no transplante de córnea através da microscopia confocal. *Oftalmologia*, XXVIII, 2005 28(4):82.

Quadrado MJ. Confocal Microscopy in Corneal Surgery. in Dynamic Imaging of the anterior segment of the eye. ESCRS symposium report - Lisbon 2005. *Eurotimes* February, 2006. *Invited speaker*

Quadrado MJ, Popper M, Morgado AM, Murta JN, Van Best JA. Diabetes and corneal cell densities in humans by in vivo confocal microscopy. *Cornea*. 2006 Aug;25(7):761-8.

Quadrado MJ. Confocal Microscopy an Evaluation Tool of Wound Healing in Corneal Surgery. Clinical Research Symposia ESCRS Barcelona 12 Set.2009. *Invited speaker*

Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, Kallinikos P, Tesfaye S, Finnigan J, Marshall A, Boulton AJ, Efron N, Malik RA. Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy, *Diabetes*. 2007 Aug;56(8):2148-54.

- Randleman JB, Hebson CB, Larson PM. Flap thickness in eyes with ectasia after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg*. 2012 May;38(5):752-7.
- Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010 Jul 8;363(2):147-55.
- Records R. The tear film. In Duane T and Jaeger E, editors: *Clinical Ophthalmology*, vol 4, Philadelphia, 1988 Harper & Row.
- Reid TW, Murphy CJ, Iwahashi CK, Foster BA, Mannis MJ. Stimulation of epithelial cell growth by the neuropeptide substance P. *J Cell Biochem* 1993 52:476-485.
- Rehany U, Ishii Y, Lahav M, Rumelt S. Ultrastructural changes in corneas of diabetic patients: an electron-microscopy study. *Cornea*. 2000 19:534-538.
- Risdall RJ, Dehner LP, Duray P, Kobrinsky N, Robison L, Nesbit ME Jr. Histiocytosis X (Langerhans' cell histiocytosis). Prognostic role of histopathology. *Arch Pathol Lab Med*. 1983 107:59-63.
- Rosa AM, Henriques J, Quadrado MJ, Murta JN. Reconstrução da superfície ocular na insuficiência límbica - alotransplantes queratolímbicos. *Oftalmologia*. 2008 32:229-236.
- Rosa AM, Quadrado MJ, Ferrão J, Marques I, Pereira H, Murta JN. Manifestações Oculares de Polineuropatia Amiloidótica Familiar Tipo I em Doentes Submetidos a Transplante Hepático. *Oftalmologia*. 2009a Vol 33(3):177-183.
- Rosa A, Marques I, Quadrado MJ, Murta JN. Ocular manifestations of amyloidotic polyneuropathy tipe I: a study with confocal microscopy. *SOE Amsterdam - 17th Congress of the European Society of Ophthalmology*. 2009b
- Rosenberg ME, Tervo TM, Immonen IJ, Muller LJ, Gronhagen-riska C, Vesaluoma MH. Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 41:2915-21.
- Rosenberg M, Tervo T, Gallar J, Acosta C, Muller L, and Moilanen J. Corneal morphology and sensitivity in lattice dystrophy type II (Familial amyloidosis, Finish type). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 42(3):634-641.
- Rosenberg ME, Tervo TM, Müller LJ, Moilanen JA, Vesaluoma MH. In vivo confocal microscopy after herpes keratitis. *Cornea*. 2002 Apr;21(3):265-9.
- Rothstein BA, Auran JD, Wittppenn JR, Koester CJ, Florakis GJ. Confocal Microscopy in Meretoja Syndrome. *Cornea*. 2002 21(4):364-367.
- Rozsa AJ, Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain*. 1982 14(2):105-20.
- Rubsamen PE, McCulley J, Bergstresser PR, Streilein JW. On the Ia immunogenicity of mouse corneal allografts infiltrated with Langerhans cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984 May;25(5):513-8
- Ruckhofer J, Böhnke M, Alzner E, Grabner G. Confocal microscopy after implantation of intrastromal corneal ring segments. *G. Ophthalmology*. 2000 Dec;107(12):2144-51;
- Saghizadeh M, Brown DJ, Castellon R, Chwa M, Huang GH, Ljubimova JY, Rosenberg S, Spirin KS, Stolitenko RB, Adachi W, Kinoshita S, Murphy G, Windsor LJ, Kenney MC, Ljubimov AV. Overexpression of matrix metalloproteinase-10 and matrix metalloproteinase-3 in human diabetic corneas: a possible mechanism of basement membrane and integrin alterations. *Am J Pathol*. 2001 158:723-734.
- Salvetat ML, Zeppieri M, Miani F, Parisi L, Felletti M, Brusini P. Comparison between laser scanning in vivo confocal microscopy and noncontact specular microscopy in assessing corneal endothelial cell density and central corneal thickness. *Cornea*. 2011 Jul;30(7):754-9.
- Sánchez-Pulgarín M, Matilla M, Martínez-de-la-Casa JM, Jerez M, Benítez-del-Castillo JM. Confocal microscopy in ocular argyrosis. *Cornea*. 2010 May;29(5):580-2.
- Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK, Sejal K, Subramaniam SV, Bandyopadhyay S, Krishnaiah S, Gaddipati S, Tiwari S, Balasubramanian D. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. *Br J Ophthalmol*. 2011 Nov;95(11):1525-9.
- Sato E, Mori F, Igarashi S, Abiko T, Takeda M, Ishiko S, Yoshida A. Corneal advanced glycation end products increase in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2001 24:479-82.
- Scarpa F, Grisan E, Ruggeri A. Automatic recognition of corneal nerve structures in images from confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Nov;49(11):4801-7.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

- Scharenberg K. The cells and nerves of the human córnea; a study with silver carbonate. *Am J Ophthalmol*. 1955 40(3):368-79.
- Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea*. 2000 19(4):421-6.
- Scott JE. Proteoglycan collagen interaction and corneal ultrastructure. *Biochem Soc Trans*. 1991 Nov 19(4):877-81.
- Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64-K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*. 1986 103:49-54.
- Schneider JA, Schulman JD. Cystinosis: a review. *Metabolism*. 1977 26:817-39.
- Schneider JA, Katz B, Melles RB. Update on nephropathic cystinosis. *Pediatr Nephrol*. 1990 4:645-53.
- Schultz RO, Van Horn DL, Peters MA, Klewin KM. Diabetic keratopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1981 79:180-99.
- Schultz RO, Peters MA, Sobocinski K, et al. Diabetic keratopathy as a manifestation of peripheral neuropathy. *Am J Ophthalmol*. 1983 96:368-71.
- Shultz RO, Matsuda M, Yee RW, Ederhauser HF, Schultz KJ. Corneal endothelial changes in diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol*. 1984 98:401-10
- Seery LS, Nau Cb, McLaren JW, Baratz Kh, Patel SV. Graft thickness, graft folds, and aberrations after descemet stripping endothelial keratoplasty for fuchs dystrophy. *Am J Ophthalmol*. 2011 Dec;152(6):910-6.
- Servais A, Morinière V, Grunfeld JP, Noel LH, Goujon JM, Chadeaux-Vekemans B, Antignac C. Late-onset nephropathic cystinosis: clinical presentation, outcome, and genotyping. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 3:27-35.
- Shah GK, Pfister D, Probst LE, Ferrieri P, Holland E. Diagnosis of microsporidial keratitis by confocal microscopy and the chromatrope stain. *Am J Ophthalmol*. 1996 121 (1): 89-91.
- Shakib M, Cunha-Vaz JG. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. IV. Junctional complexes of the retinal vessels and their role on their permeability. *Exp. Eye Res*. 1966 5:229-234.
- Schrems-Hoesl LM, Schrems WA, Cruzat A, Shahatit BM, Bayhan HA, Jurkunas UV, Hamrah P. Cellular and subbasal nerve alterations in early stage Fuchs' endothelial corneal dystrophy: an in vivo confocal microscopy study. *Eye (Lond)*. 2013 Jan;27(1):42-9.
- Shenoy R, Khandekar R, Bialasiewicz A, Al Muniri A. Corneal endothelium in patients with diabetes mellitus: a historical cohort study. *Eur J Ophthalmol*. 2009 May-Jun;19(3):369-75.
- Shi W, Li S, Liu M, Jun H, Xie L. Antifungal chemotherapy for fungal keratitis guided by in vivo confocal microscopy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008 Apr;246(4):581-6.
- Shi W, Li S, Gao H, Wang T, Xie L. Modified deep lamellar keratoplasty for the treatment of advanced-stage keratoconus with steep curvature. *Ophthalmology*. 2010 117(2):226-31.
- Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells. *Stem cells*. 2007 25:1402-14.
- Shotten D. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. *J Cell Sci* 1989 175 – 206.
- Shukla AN, Cruzat A, Hamrah P. Confocal microscopy of corneal dystrophies. *Semin Ophthalmol*. 2012 Sep-Nov;27(5-6):107-16
- Silva-Araújo AC, Tavares MA, Cotta JS, Castro-Correia JF. Aqueous outflow system in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1993 Mar;231(3):131-5.
- Silva SF, Loureiro CM, Almeida H, Otel J, Domingues JP, Silva JS, Quadrado MJ, Morgado AM. Evaluation of Corneal Nerves Morphology for Diabetic Peripheral Neuropathy Assessment. Proceedings of IEEE ENBENG 2012, 2st Portuguese Meeting in Bioengineering. DOI: 10.1109/ENBENG.2012.6331376.
- Simpson J, Chyong Simpson J, Nien CJ, Flynn K, Jester B, Cherqui S, Jester J. Quantitative in vivo and ex vivo confocal microscopy analysis of corneal cystine crystals in the Ctns^{-/-}-knockout mouse. *Molecular Vision*. 2011 17:2212-22.
- Sin S, Simpson TL. The repeatability of corneal and corneal epithelial thickness measurements using optical coherence tomography. *Optom Vis Sci*. 2006 Jun;83(6):360-365.

- Sonigo B, Iordanidou V, Chong-Sit D, Auclin F, Ancel JM, Labbé A, Baudouin C. *In vivo* corneal confocal microscopy comparison of intralase femtosecond laser and mechanical microkeratome for laser *in situ* keratomileusis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jul;47(7):2803-11.
- Su PY, Hu FR, Chen YM, Han JH, Chen WL. Dendritiform cells found in central cornea by in-vivo confocal microscopy in a patient with mixed bacterial keratitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2006 14(4):241-4.
- Stachs O, Zhivov A, Kraak R, Hovakimyan M, Wree A, Guthoff R. Structural-functional correlations of corneal innervation after LASIK and penetrating keratoplasty. *J Refract Surg*. 2010 Mar;26(3):159-6
- Stave J, Slowik C, Somodi S, Hahnel C, Grümmer G, Guthoff R. Keratocytes density in the in vivo cornea. Automatic quantification with a modified confocal microscope MICROPHTHAL. *Klin Monb Augenheilkd*. 1998 Jul;213(1):38-44.
- Stave J, Zinser G, Grummer G, Guthoff R. Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of *in vivo* presentation of corneal structures. *Ophthalmologe*. 2002 Apr;99(4):276-80.
- Stelzer EH, Wacker I, De Mey JR. Confocal fluorescence microscopy in modern cell biology. *Semin Cell Biol*. 1991 Jun;2(3):145-52.
- Stonecipher KG, Green PT. Non-contact confocal microscopy of the tear film in unoperated eyes. *J Refract Surg*. 2007 Apr;23(4):417-9.
- Svishchev GM. Microscope for the study of transparent light-scattering objects in incident light. *Opt Spectrosc*. 1969 30:188-91.
- Svishchev GM. Image contrast in a microscope with synchronous object scanning by slit field diagrams. *Opt Spectrosc*. 1971 30, 188–191.
- Tabatabay CA, Bumbacher M, Baumgartner B, Leuenberger PM. Reduced number of hemidesmosomes in the corneal epithelium of diabetics with proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1988 226(4):389–92.
- Takezawa Y, Shiraihi A, Noda E, Hara Y, Yamaguchi, Uno T, Ohashi Y. Effectiveness of *in vivo* confocal microscopy in detecting filamentous fungi during clinical course of fungal keratitis. *Cornea*. 2010 Dec;29(12):1346-52.
- Tavakoli M; Hossain P; Malik RA. Clinical applications of corneal confocal microscopy. *Clin Ophthalmol*. 2008 Jun;2(2)435-445.
- Thanos M, Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. Ocular surface reconstruction with cultivated limbal epithelium in a patient with unilateral stem cell deficiency caused by Epidermolysis bullosa dystrophica hallopeau-Siemens. *Cornea*. 2010 Apr;29(4):462-4.
- Tavakoli M, Kallinikos P, Iqbal A, Herbert A, Fadavi H, Efron N, Boulton AJ, A Malik R. Corneal confocal microscopy detects improvement in corneal nerve morphology with an improvement in risk factors for diabetic neuropathy. *Diabet Med*. 2011a Oct;28(10):1261-7.
- Tavakoli M, Boulton AJM, Efron N, Malik, RA. Increased Langerhan cell density and corneal nerve damage in diabetic patients: Role of immune mechanisms in human diabetic neuropathy. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2011b 34:7-11.
- Tavares R, Coelho D, Macario MC, Torres A, Quadrado MJ, Murta J. Evaluation of treatment with cysteamine eyedrops for cystinosis with confocal microscopy. *Cornea*. 2009 28:938-40.
- Taylor HR, Kimsey RA. Corneal epithelial basement membrane changes in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981 20:548–53.
- Tervo T, Moilanen J. *In vivo* confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. *Prog Ret Eye Res*. 2003 22:339–358.
- Thornton IL, Foulks GN, Eiferman RA. Confocal microscopy of central toxic keratopathy. *Cornea*. 2012 Aug;31(8):934-6.
- Thoft RA, Wiley LA, Sundarraj N. The multipotential cells of the limbus. *Eye (Lond)*. 1989 3(Pt 2):109-13.
- Tomii S, Kinoshita S. Observations of human corneal epithelium by tandem scanning confocal microscope. *Scanning*. 1994 16:305–6.
- Torres J, Herreras JM, Quadrado MJ, Fonseca P, Rodriguez-Ares MT, Benitez del Castillo JM, Alio J, Muñoz-Moreno J, Calonge M. Limbal transplantation in ocular surface disease: multicenter retrospective case series analysis. *Investigative Ophthalmol Vis Sci*. 2005 46:ARVO E-abstract 4057.

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

Torres J, Fernández I, Quadrado MJ, Herreras JM, Rodríguez-Ares MT, Benítez del Castillo JM, Alió J, Muñoz MF, Calonge M. Limbal Transplantation: Multicenter Retrospective Case Series Analysis. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2008 Jul;83(7):417-22.

Torres J, Enriquez de Salamanca A, Fernandez I, Quadrado MJ, Murta JN, Rodriguez-Ares MT, Benitez del Castillo JM, Stern ME, Calonge M. Activation of MAPK signaling pathway and NF-kappaB activation in pterygium and ipsilateral pterygium-free conjunctival specimens. *Investigative Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jul 29;52(8):5842-52.

Touboul D, Efron N, Smadja D, Praud D, Malet F, Colin J. Corneal Confocal Microscopy Following Conventional, Transepithelial, and Accelerated Corneal Collagen Cross-linking Procedures for Keratoconus. *J Refract Surg*. 2012 Nov;28(11):769-76.

Townsend W M. The limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1991 89:721–56.

Traversi C, Martone G, Malandrini A, Tosi GM, Caporossi A. *In vivo* confocal microscopy in recurrent granular dystrophy in corneal graft after penetrating keratoplasty. *Clin Exp Ophthalmol*. 2006 34(8):808-810.

Tsai RJ, Tseng SC. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea*. 1994 Sep;13(5):389-400.

Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med*. 2000 343(2):86-93.

Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye(Lond)* 1989 3(Pt 2):141-57.

Tsilou ET, Rubin BI, Reed GF, Iwata F, Gahl W, Kaiser-Kupfer MI. Age-related prevalence of anterior segment complications in patients with infantile nephropathic cystinosis. *Cornea*. 2002 Mar;21(2):173-6.

Tsilou ET, Thompson D, Lindblad AS, Reed GF, Rubin B, Gahl W, Thoene J, Del Monte M, Schneider JA, Granet DB, Kaiser-Kupfer MI. A multicentre randomised double masked clinical trial of a new formulation of topical cysteamine for the treatment of corneal cystine crystals in cystinosis. *Br J Ophthalmol*. 2003 87:28-3.

Tsilou ET, Rubin BI, Reed G, Caruso RC, Iwata F, Balog J, Gahl WA, Kaiser-Kupfer MI. Nephropathic cystinosis: posterior segment manifestations and effects of cysteamine therapy. *Ophthalmology*. 2006 113:1002-9.

Tsilou E, Zhou M, Gahl W, Sieving PC, Chan CC. Ophthalmic manifestations and histopathology of infantile nephropathic cystinosis: report of a case and review of the literature. *Surv Ophthalmol*. 2007 52:97-105.

Tsubota K, Chiba K, Shimazaki J. Corneal epithelium in diabetic patients. *Cornea*. 1991 Mar;10(2):156-60.

Tsubota K, Yamada M. The effect of aldose reductase inhibitor on the corneal epithelium. *Cornea*. 1993 Mar;12(2):161-2.

Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1996 102:1486–96.

Twigg SM, Chen MM, Joly AH, et al. Advanced glycosylation end products up-regulate connective tissue growth factor (insulin-like growth factor-binding protein-related protein 2) in human fibroblasts: a potential mechanism for expansion of extracellular matrix in diabetes mellitus. *Endocrinology*. 2001 142:1760–69.

Ueda A, Nishida T, Otori T, Fujita H. Electron-microscopic studies on the presence of gap junctions between corneal fibroblasts in rabbits. *Cell Tissue Res*. 1987 Aug;249(2):473-5.

Vanathi M, Tandon R, Sharma N, Titiyal JS, Pandey RM, Vajpayee RB. In-vivo slit scanning confocal microscopy of normal corneas in Indian eyes. *Indian J Ophthalmol*. 2003 Sep;51(3):225-30.

Vera LS, Guedry J, Delcampe A, Roujeau JC, Brasseur G, Muraine M. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal changes in chronic Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Cornea*. 2009 May;28(4):401-7.

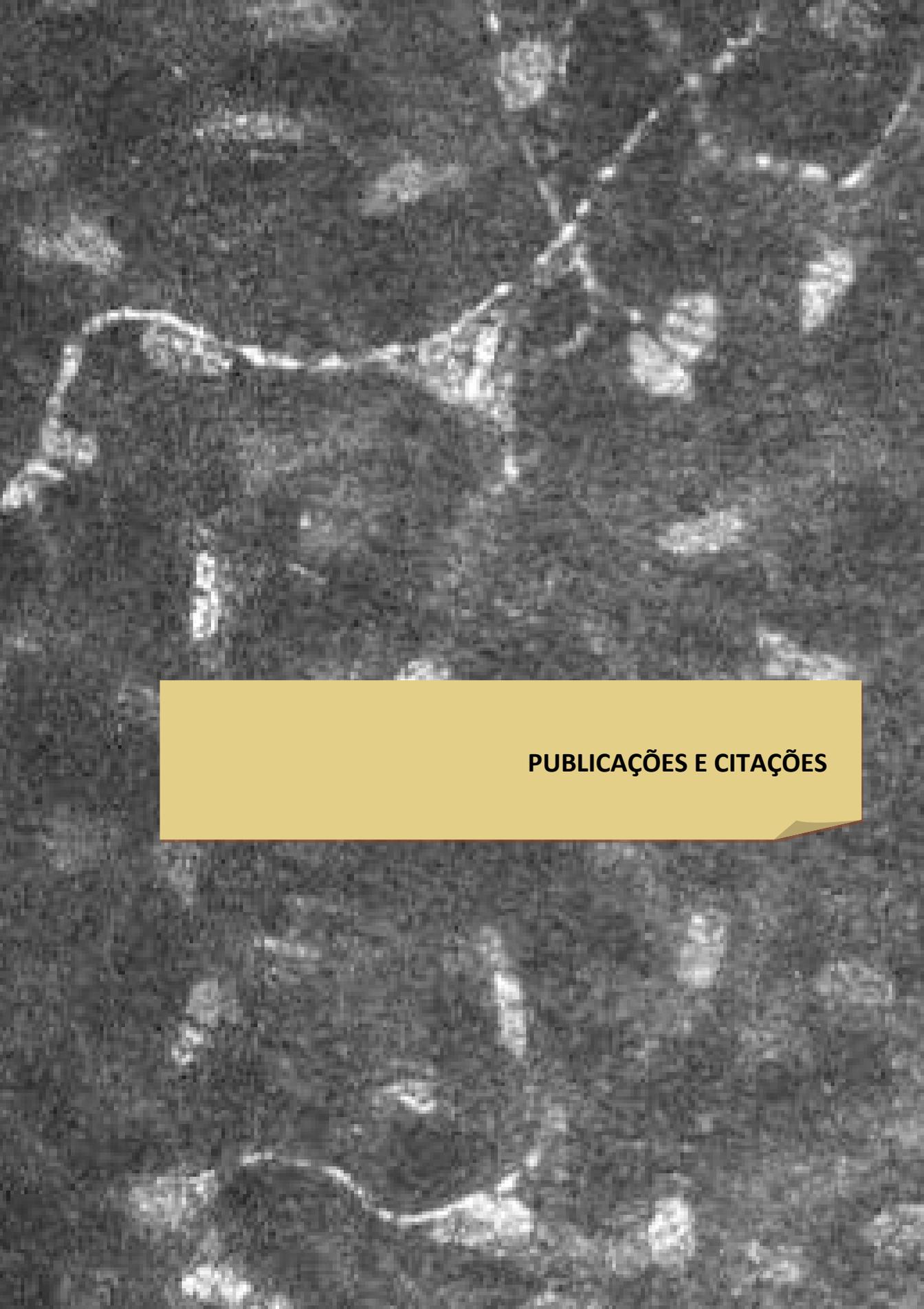
Villani E, Beretta S, Galimberti D, Viola F, Ratiglia R. In vivo confocal microscopy of conjunctival roundish bright objects: young, older, and Sjögren subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jul 1;52(7):4829-32.

Vracko R. Basal lamina layering in diabetes mellitus. Evidence for accelerated rate of cell death and cell regeneration. *Diabetes*. 1974 23: 94–104.

Wang J, Fonn D, Simpson TL, et al. Precorneal and pre- and postlens tear film thickness measured indirectly with optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 44:2524–28

Waring GO, Bourne BM, Edelhauser HF et al. The corneal endothelium normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*. 1982 Jun;89(6):531-90.

- Weiss JS, Khemichian AJ. Differential diagnosis of Schnyder corneal dystrophy. *Dev Ophthalmol*. 2011 48:67-96.
- West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006 38(10):1625-31.
- Wheeldon CE, Hadden OB, Niederer RL, McGhee CN. Presumed late diffuse lamellar keratitis progressing to interface fluid syndrome. *J Cataract Refract Surg*. 2008 Feb;34(2):322-6.
- Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE, Daley TE. Diagnosis of Acanthamoeba keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea*. 1995 Jan;14(1):10-7.
- Whitear M. An electron microscope study of the cornea in mice, with special reference to the innervation. *J Anat* 1960 94:387-409.
- Whitsett CF, Stulting RD. The distribution of HLA antigens on human corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984 May;25(5):519-24.
- Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK, editors. Harrison Medicina Interna, 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. p.227-8.
- Wilson SE, Hong JW. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea*. 2000 Jul;19(4):417-20.
- Wilson SE, Mohan RR, Hong JW, Lee JS, Choi R, Mohan RR. The wound healing response after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy: elusive control of biological variability and effect on custom laser vision correction. *Arch Ophthalmol*. 2001 Jun;119(6):889-96.
- Wilson T. Three-dimensional imaging in confocal systems. *J Microsc*. 1989 Feb;153(Pt 2):161-9.
- Wolff E. The muco-cutaneous junction of the lid margin and the distribution of the tear fluid. *Trans. Ophthalmol. Soc*. 1946 UK 66,291-308.
- Woodward M, Randleman JB, Larson PM. In vivo confocal microscopy of polymorphic amyloid degeneration and posterior crocodile shagreen. *Cornea*. 2007 Jan;26(1):98-101.
- Wotton SF, Jeacocke RE, Maciewicz RA, Wardale Rj, Duance VC. The application of scanning confocal microscopy in cartilage research. *Histochem J*. 1991 Jul;23(7):328-35.
- Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, Ishibashi Y, Oikawa Y, Tokoro M, Sugiyama K. Bowman's layer encystment in cases of persistent Acanthamoeba keratitis. *Clin Ophthalmol*. 2012 6:1245-51.
- Yokoi N, Niiya A, Komuro A, Yokogaki S, Naka H, Awata T, Honma Y, Yamada J, Tei M, Kinoshita S. Effects of aldose reductase inhibitor CT-112 on the corneal epithelial barrier of galactose-fed rats. *Curr Eye Res*. 1997 16:595-9.
- You L, Kruse FE, Völcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Mar;41(3):692-702.
- Yue BY, Sugar J, Schrode K. Collagen staining in corneal tissues. *Curr Eye Res*. 1986 Aug;5(8):559-64.
- Zander E, Weddell G. Observations on the innervation of the córnea. *Journal of Anatomy*. 1951 185:68-99.
- Zheng T, Xu J. Age-related changes of human limbus on in vivo confocal microscopy. *Cornea*. 2008 27:782-786.
- Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005 Oct;243(10):1056-61.
- Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the corneal epithelium of healthy volunteers and contact lens wearers. *Cornea*. 2007 Jan;26(1):47-54.
- Zhivov A, Beck R, Guthoff RF. Corneal and conjunctival findings after mitomycin C application in pterygium surgery: an in-vivo confocal microscopy study. *Acta Ophthalmol*. 2009 Mar;87(2):166-72.



PUBLICAÇÕES E CITAÇÕES

Os estudos que suportam o trabalho científico aqui apresentado foram objecto de várias publicações e comunicações:

- Silva, Susana F.; Loureiro, Custodio F.M.; Almeida, Hugo; Otel, Iulian; Domingues, Jose Paulo; Silva, Jose Silvestre; Quadrado, Maria Joao; Morgado, Antonio Miguel, Evaluation of corneal nerves morphology for diabetic peripheral neuropathy assessment, *Proceedings of ENBENG 2012 IEEE 2nd Portuguese Meeting in Bioengineering*, DOI: 10.1109/ENBENG.2012.6331376
- Pereira H, Almeida M, Cruz M, Marques I, Quadrado MJ, Murta JN. Avaliação da zona dadora, após realização de transplante autólogo de limbo e conjuntiva no tratamento de pterígio primário e recorrente. *Oftalmologia* 2011; Vol 35, nº3, 259-268
- Costa E, Garrido I, Veríssimo J, Quadrado MJ, Proença R, Murta JN. Avaliação da Microanatomia do Limbo. Prémio SPO 2010 – Melhor Apresentação Cirurgia Segmento Anterior. *Oftalmologia* 2011; Vol 35, nº2, 115-121
- Costa E, Quadrado MJ, Marques I, Murta JN. Microscopia Confocal no diagnóstico de Queratites Infecciosas. *Exp. Ophthalmol.* 2009 (35):77-83
- Tavares R, Fonseca P, Macário MC, Torres A, Quadrado MJ, Murta JN. Evaluation of treatment with eyedrops for cystinosis with Confocal Microscopy. *Cornea.* 2009 Sep;28(8):938-40
 - Citado por:
 - C1. Y J Shin, J M Seo, T Y Chung, J Y Hyon, W R Wee. Effect of Cysteamine on Oxidative Stress-induced Cell Death of Human Corneal Endothelial Cells. *Current Eye Research*, 2011, 36, 10 : 910-917
 - C2. J Simpson, C J Nien, K Flynn, B Jester, S Cherqui, J Jester. Quantitative in vivo and ex vivo confocal microscopy analysis of corneal cystine crystals in the Ctns-/- knockout mouse. *Mol Vis.* 2011; 17: 2212–2220.
 - C3. Hovakimyan M, Petersen J, Maass F, Reichard M, Witt M, et al. Corneal Alterations during Combined Therapy with Cyclodextrin/Allopregnanolone and Miglustat in a Knock-Out Mouse Model of NPC1 Disease. *PLoS ONE* 2011 6(12): e28418. doi:10.1371/journal.pone.0028418
- Torres J, Fernández I, Quadrado MJ, Herreras JM, Rodríguez-Ares MT, Benítez del Castillo JM, Alió J, Muñoz MF, Calonge M. Limbal Transplantation: Multicenter Retrospective Case Series Analysis. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2008 Jul;83(7):417-22.

Citado por:

- C1. D Aslan, R F Akata, Dyskeratosis congenita and limbal stem cell deficiency, *Experimental Eye Research*, 90, 3, 2010, 472-473,
- C2. C. Vergallo, T. Fonseca, G. Pizzi, L. Dini, Lycopersicon esculentum lectin is a marker of transient amplifying cells in in vitro cultures of isolated limbal stem cells, *Tissue and Cell*, 42, 4, 2010, 259-265
- C3. W. Sekundo, K. Droutsas, C. Cursiefen, Operative Techniken bei chirurgischer Behandlung primärer und rezidivierender Pterygien. *Der Ophthalmologe* 2010, 107, 6, 525-528

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

- Quadrado, MJ, Popper, M, Morgado, AM, Murta, JN, Van Best, JA, Diabetes and Corneal Cell Densities in Humans by In Vivo Confocal Microscopy, *Cornea* 25(7):761-768, 2006.

Citado por:

- C1. Bikbova, G., Oshitari, T., Tawada, A., Yamamoto, S. Corneal Changes in Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reviews*, 8 (4), July 2012 , 294-302
- C2. E. Nitoda, P. Kallinikos, A. Pallikaris, J. Moschandra, G. Amoirdis, E. S. Ganotakis, and M. Tsilimbaris. Correlation of Diabetic Retinopathy and Corneal Neuropathy Using Confocal Microscopy. *Current Eye Research*, 2012, 37, 10: 898-906 DOI: 10.3109/02713683.2012.683507
- C3. Hume DA, Lovblom LE, Ahmed A, Yeung E, Orszag A, Shin TM, Bril V, Perkins BA. Higher magnification lenses versus conventional lenses for evaluation of diabetic neuropathy by corneal in vivo confocal microscopy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012 May 10.
- C4. Maryam Nabavi Nouri, Ausma Ahmed, Vera Bril, Andrej Orszag, Eduardo Ng, Patti Nwe, Bruce A. Perkins, Diabetic Neuropathy and Axon Reflex-Mediated Neurogenic Vasodilatation in Type 1 Diabetes. *PLoS ONE* 2012 7(4): e34807. doi:10.1371/journal.pone.0034807
- C5. Ahmed, A, Bril, V, Orszag, A, Paulson, J, Yeung, E, Ngo, M, Orlov, S, Perkins, BA, Detection of Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy by Corneal Confocal Microscopy in Type 1 Diabetes: A concurrent validity study. *Diabetes Care* 2012, Volume: 35 Issue: 4 Pages: 821-828 DOI: 10.2337/dc11-1396
- C6. Brown, G, Siegel, E, Staples, S, Doyle, J, Chang, JY, Diabetes and corneal endothelial cell characteristics: a study based on Eye Bank data. *Eye Reports* 2011; 1:e9 2011
- C7. Zheng, X, Shiraishi, A, Okuma, S, Mizoue, S, Goto, T, Kawasaki, S, Uno, T, Miyoshi, T, Ruggeri, A, Ohashi, Y, In Vivo Confocal Microscopic Evidence of Keratopathy in Patients with Pseudoexfoliation Syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011, 52 (3): 1755-1761
- C8. Pritchard, N, Edwards, K, Shahidi, AM, Sampson, GP, Russell, AW, Malik, RA, Efron, N, Corneal Markers of Diabetic Neuropathy. *The Ocular Surface*, 2011, 9, (1): 17-28.
- C9. Hasan, SA, The Cornea in Diabetes Mellitus in *Diabetic Retinopathy: Evidence-Based Management*. David J. Browning (Editor), 2010, Springer
- C10. Módis L Jr, Szalai E, Kertész K, Kemény-Beke A, Kettesy B, Berta A., Evaluation of the corneal endothelium in patients with diabetes mellitus type I and II. *Histol Histopathol*. 2010 Dec;25(12):1531-7.
- C11. Ozdamar, Y., Cankaya, B., Ozalp, S., Acaroglu, G., Karakaya, J., Özkan, S.S., Is There a Correlation Between Diabetes Mellitus and Central Corneal Thickness?, *Journal of Glaucoma*, 2010, 19 (9):613-616
- C12. Xu, Z., Wang, L., Jing, Y., Niu, C., Li, J. Depositions of corneal epithelial basement membrane in patient with type 2 diabetes mellitus under the HRT III Rostock Cornea Module. *Chinese Ophthalmic Research* 2009 27 (6): 517-520
- C13. W. Chen, C. Lin, P. Ko, P. Yeh, Y. Kuan, F. Hu, C. Yang. In Vivo Confocal Microscopic Findings of Corneal Wound Healing after Corneal Epithelial Debridement in Diabetic Vitrectomy. *Ophthalmology* 2009, Vol. 116, (6): 1038-1047
- C14. Midená E, Cortese M, Miotto S, Gambato C, Cavarzeran C, Ghirlando A. Confocal microscopy of corneal sub-basal nerve plexus: a quantitative and qualitative analysis in healthy and pathological eyes. *J Refract Surg* 2009; 25: 5125-130
- C15. Mitra Tavakoli, Parwez Hossain, Rayaz A Malik. Clinical applications of corneal confocal microscopy. *Clin Ophthalmol*. 2008 June; 2(2): 435-445.
- C16. Javadi, M.A., Zarei-Ghanavati, S. Cataracts in Diabetic Patients: A Review Article. *Journal of Ophthalmic and Vision Research* 2008; Vol. 3, (1): 52-65
- C17. Y. Hu, Y. Matsumoto, E. Adan, M. Dogru, K. Fukagawa, K. Tsubota, H. Fujishima Corneal In Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy in Patients with Atopic Keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 2008; 115, 11: 2004-2012
- C18. Beardsley, RM, de Paiva, CS, Power, DFMS, Pflugfelder, SC. Desiccating Stress Decreases Apical Corneal Epithelial Cell Size-Modulation by the Metalloproteinase Inhibitor Doxycycline. *Cornea* 2008; 27(8):935-940
- C19. Wei, Ji-Ye, Ornberg, R.L., Graff, G., Use of thy1-fp transgenic mouse for the identification of ophthalmic agents. 2008; *Pre-grant patent publication 20080188573* available from the US Patent Office
- C20. Dhaliwal JS, Kaufman SC, Chiou AGY. Current applications of clinical confocal microscopy. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18: 300-307
- C21. Gao Yan, Li Bing, Zhao Ju wei. In vivo confocal microscopy histological observation and evaluation of sensation in PDR patients' cornea. *Chinese Journal of Practical Ophthalmology* 2007, 25 (11): 1190-1193
- C22. Javadi M.A., Zarei-Ghanavati S. Cataract and Diabetes Mellitus. *Bina J Ophthalmol* 2007 13 (1): 89-103.

- Torres J, Herreras JM, Quadrado MJ, Fonseca P, Rodriguez-Ares MT, Benitez del Castillo JM, Alio J, Muñoz-Moreno J, Calonge M. Limbal transplantation in ocular surface disease: multicenter retrospective case series analysis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005;84:ARVO E-abstract 4057.
- Murta JN, Quadrado MJ, Fonseca P, Faria R. Limbal conjunctival autograft transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005;46:ARVO E-Abstract 4868. S:213
- M. J. Quadrado, M. Popper, A. M. Morgado, J. N. Murta, J. A. Van Best, L. J. Muller, Highly reflective cells in the corneal stroma visualized by in vivo confocal microscopy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 879 Suppl. S 2005
- M. Popper, M. J. Quadrado, A. M. Morgado, J. N. Murta, J. A. Van Best, L. J. Muller, Subbasal nerves and highly reflective cells in corneas of diabetic patients: in vivo evaluation by confocal microscopy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 2194 Suppl. S 2005.

Citado por:

- C1. Tavakoli M, Boulton AJM, Efron N, Malik, RA. Increased Langerhan cell density and corneal nerve damage in diabetic patients: Role of immune mechanisms in human diabetic neuropathy. *Contact Lens and Anterior Eye* 2011; 34: 7-11
 - C2. Ferreira A, Morgado AM, Silva JS. Corneal nerves segmentation and morphometric parameters quantification for early detection of diabetic neuropathy. *IFMBE Proceedings. Vol. 29. XII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing* 2010. DOI 10.1007/978-3-642-13039-7. pp 264-267
 - C3. Dhaliwal JS, Kaufman SC, Chiou AGY. Current applications of clinical confocal microscopy. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18: 300-307
 - C4. Quadrado MJ, Popper M, Morgado AM, Murta JN, Van Best JA. Diabetes and Corneal Cell Densities in Humans by In-vivo Confocal Microscopy. *Cornea* 2006; 25: 761-768
 - C5. Midena E, Brugin E, Ghirlando A, Sommovilla M, Avogaro A. Corneal diabetic neuropathy: a confocal microscopy study. *J Refract Surg* 2006; 22(9 Suppl): S1047-1052
- Monika Popper, António Miguel Morgado, Maria J. Quadrado, Jaap A. van Best, Corneal Cell Density Measurement In Vivo by Scanning-Slit Confocal Microscopy: Methods and Validation, *Ophthalmic Res* 2004;36:270-276.

Citado por:

- C1. Karimi A-H., Wong A., Bizheva K. Automated detection and cell density assessment of keratocytes in the human corneal stroma from ultrahigh resolution optical coherence tomograms. *Biomedical Optics Express* 2011; 2, 10: 2905-2916
- C2. Kaweh M., Efstratios M., Tarek S., et al. Visualization of the Trabeculo-Descemet Membrane in Deep Sclerectomy After Nd:YAG Goniopuncture: An In Vivo Confocal Microscopy Study. *Archives of Ophthalmology* 2011; 129, 10: 1305-1310
- C3. Jonuscheit S., Doughty M. J., Ramaesh K. In vivo confocal microscopy of the corneal endothelium: comparison of three morphometry methods after corneal transplantation. *Eye* 2011; 25, 9: 1130-1137
- C4. Nieto-Bona A, Gonzalez-Mesa A, Nieto-Bona MP, et al. Short-term Effects of Overnight Orthokeratology on Corneal Cell Morphology and Corneal Thickness. *Cornea* 2011; 30, 6: 646-654
- C5. Bergonzi C, Giani A, Blini M, et al. Evaluation of Prostaglandin Analogue Effects on Corneal Keratocyte Density Using Scanning Laser Confocal Microscopy. *Journal of Glaucoma* 2010; 19, 9: 617-621
- C6. Pirnerová, L., Horáčková, M., Vlková, E., Hlinomazová, Z., Trnková, V., Strmeňová, E. The use of confocal corneal microscopy in the clinical practice | [Využití konfokální mikroskopie rohovky v klinické praxi]. *Ceska a Slovenska Oftalmologie* 2010; 66, 6: 239-247
- C7. Nieto-Bona A, Lorente-Velazquez A, Collar CV, et al. Intraocular Stray light and Corneal Morphology Six Months after LASIK. *Current Eye Research* 2010; 35, 3: 212-219

AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DA CÓRNEA POR MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

- C8. Ferrari G, Tedesco S, Delfini E, et al. Laser Scanning In Vivo Confocal Microscopy in a Case of Terrien Marginal Degeneration. *Cornea* 2010; 29, 4: 471-475
 - C9. McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Automated Assessment of Keratocyte Density in Stromal Images from the ConfoScan 4 Confocal Microscope. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010; 51, 4: 1918-1926
 - C10. Niederer RL, McGhee CNJ. Clinical in vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 2010; 29, 1: 30-58
 - C11. Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N. Confocal Microscopy of the Bulbar Conjunctiva in Contact Lens Wear. *Cornea* 2010; 29, 1: 43-52
 - C12. Efron, N, Al-Dossari, M, Pritchard, N. In vivo confocal microscopy of the bulbar conjunctiva. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 2009; 37, 4: 335-344.
 - C13. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2009; 37, 1: 100-117.
 - C14. Mendrinos E, Dosso A, Sommerhalder J, Shaarawy T., Coupling of HRT II and AS-OCT to evaluate corneal endothelial cell loss and in vivo visualization of the Ahmed glaucoma valve implant. *Eye*; Advance online publication, 24 October 2008
 - C15. Resch, M.D., Imre, L., Tapasztó, B., Németh, J., Confocal microscopic evidence of increased Langerhans cell activity after corneal metal foreign body removal. *European Journal of Ophthalmology* 2008; 18, 5: 703-707.
 - C16. Yuasa, M, Kobayashi, A, Yokogawa, H, Sugiyama, K. In Vivo Laser Confocal Microscopic Analysis of Murine Cornea and Lens Microstructures. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging* 2008; 39, 5: 391-396.
 - C17. James Wolffsohn. *Ophthalmic Imaging. Elsevier Health Sciences*, 2008. ISBN 0750688572, 9780750688574
 - C18. Niederer, RL. Laser scanning in vivo confocal microscopy of corneal microstructure in inherited and acquired corneal disease. *Ph.D thesis, Department of Ophthalmology, University of Auckland*, 2008.
 - C19. McLaren JW, Patel SV, Nau CB, et al. Automated assessment of keratocyte density in clinical confocal microscopy of the corneal stroma. *Journal of Microscopy-Oxford* 2008; 229, 1: 21-31
 - C20. Patel DV, McGhee CNJ. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clin Exp Ophthalmol* 2007; 35: 71-88
 - C21. Villani E, Galimberti D, Viola F, Mapelli C, Ratiglia R. The cornea in Sjogren's syndrome: An in vivo confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2017-2022
 - C22. Efron N, Morgan PB, Makrynioti D. Chronic morbidity of corneal infiltrative events associated with contact lens wear. *Cornea* 2007; 26: 793-799
 - C23. Zhivov A, Stachs O, Kraak R, Stave J, Guthoff RF. In vivo confocal microscopy of the ocular surface. *Ocul Surf* 2006; 4: 81-93
 - C24. Navratil M, Mabbott GA, Arriaga EA. Chemical microscopy applied to biological systems. *Analytical Chemistry* 2006; 78: 4005-4019
 - C25. Quadrado MJ, Popper M, Morgado AM, Murta JN, Van Best JA. Diabetes and Corneal Cell Densities in Humans by In-vivo Confocal Microscopy. *Cornea* 2006; 25: 761-768
 - C26. Wolffsohn JS, Peterson RC. Anterior ophthalmic imaging. *Clin Exp Optom* 2006; 89: 205-214
 - C27. Chiou AGY, Kaufman SC, Kaufman HE, Beuerman RW. Clinical corneal confocal microscopy. *Surv Ophthalmol* 2006; 51: 482-500
 - C28. McLaren JW, Nau CB, Kitmann AS, Bourne WM. Keratocyte Density: Comparison of Two Confocal Microscopes. *Eye Contact Lens* 2005; 31:28-33
 - C29. Patel DV, In vivo confocal microscopy of the cornea in health and disease. *Ph.D thesis, Department of Ophthalmology, University of Auckland*, 2005.
- Quadrado MJ, Popper M, Morgado M, Van Best JA, Murta JN, Müller LJ: Highly reflective cells in the stroma of diabetic patients visualized by in vivo confocal microscopy, *Ophthalmic Research* 2004, Vol. 36, Suppl. 1
 - Popper M, Quadrado MJ, Morgado M, Murta JN, Van Best JA, Müller LJ: Subbasal nerves and possible dendritic cells in diabetic patients by in vivo scanning-slit confocal microscopy, *Ophthalmic Research* 2004, Vol. 36, Suppl. 1

- Popper M, Morgado AM, Quadrado MJ, Van Best JA, In vivo corneal cell density measurement by scanning-slit confocal microscopy: method and validation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: U133-U133 150 Suppl. 1 APR 2004
- M.J. Quadrado, M. Morgado, M. Popper, J. Murta, J. Van Best, and J. Cunha–Vaz, Cell Density In Six Corneal Layers Of Diabetic Patients And Healthy Controls By Confocal Microscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: U315-U315 3812 Suppl. 2 APR 2004
- Maria João Quadrado, Monika Popper, Miguel Morgado, Joaquim Murta, Jaap van Best, Microscopia Confocal in Vivo: Alterações Morfológicas no Queratocone, *Experientia Ophthalmologica*, 30, 1, p.11-16, 2004.
- Popper M, Quadrado MJ, Morgado AM, Murta J, Van Best JA, The use of confocal microscopy for evaluation of cell densities in diabetic patients, *Ophthalmic Res.*, Vol. 35, Suppl. 1, 2003