



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RODRIGO BUENO DO PRADO

**VIABILIDADE CELULAR, MEDIDAS DIGITAIS, E
CARACTERÍSTICAS DE ROLAGEM DE ENXERTOS PRÉ-
CORTADOS PARA CERATOPLASTIA ENDOTELIAL PRÉ-
DESCEMET PELO BANCO DE OLHOS**

Londrina
2021

RODRIGO BUENO DO PRADO

**VIABILIDADE CELULAR, MEDIDAS DIGITAIS, E
CARACTERÍSTICAS DE ROLAGEM DE ENXERTOS PRÉ-
CORTADOS PARA CERATOPLASTIA ENDOTELIAL PRÉ-
DESCEMET PELO BANCO DE OLHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para o título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Antônio Marcelo Casella
Coorientadora: Dra. Ana Paula T. M. Oguido

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

P896 Prado, Rodrigo Bueno.
VIABILIDADE CELULAR, MEDIDAS DIGITAIS, E CARACTERÍSTICAS DE ROLAGEM DE ENXERTOS PRÉ-CORTADOS PARA CERATOPLASTIA ENDOTELIAL PRÉ-DESCEMET PELO BANCO DE OLHOS / Rodrigo Bueno Prado. - Londrina, 2021.
85 f. : il.

Orientador: Antônio Marcelo B Casella.
Coorientador: Ana Paula M T Oguido.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Ceratoplastia endotelial - Tese. 2. Banco de Olhos - Tese. I. Casella, Antônio Marcelo B. II. Oguido, Ana Paula M T. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 617.7

RODRIGO BUENO DO PRADO

**VIABILIDADE CELULAR, MEDIDAS DIGITAIS, E
CARACTERÍSTICAS DE ROLAGEM DE ENXERTOS PRÉ-
CORTADOS PARA CERATOPLASTIA ENDOTELIAL PRÉ-
DESCEMET PELO BANCO DE OLHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para o título de Doutor em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Antônio Marcelo B.
Casella
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Waldiceu Verri Jr.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Antônio Carlos Lottelli Rodrigues
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Sérgio Margues Borghi
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 21 de setembro de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese para toda minha família

AGRADECIMENTOS

À Flávia Thais Ramos, minha eterna companheira, agradecimentos especiais por estar ao meu lado e ser meu porto seguro. Ao Joaquim Ramos do Prado, meu filho, vocês dois constituem a parte mais importante da minha vida.

Agradeço a todos da minha família, principalmente, Sofia Kawka do Prado, Roberto Bueno do Prado e Letícia Kawka do Prado por todo empenho e dedicação.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Marcelo Casella, por toda paciência e empenho com a tese de doutorado, agradeço por proporcionar este estudo que planejo há tanto tempo.

Agradecimentos a Dra. Ana Paula Oguido por disponibilizar seu tempo neste estudo, admiro suas condutas como pessoa, cirurgiã e pesquisadora.

Agradecimentos ao professor Waldiceu Verri Jr. por estimular seus alunos e elevar o nome da UEL e do Brasil. Agradecimentos ao pesquisador Sergio Marques Borghi, obrigado por toda atenção e dedicação.

Agradecimentos aos professores Dr. Álvaro Shiguematsu, Dr. Antônio Carlos Lottelli Rodrigues e Dra. Silvana Artioli Schellini.

Agradecimentos especiais ao Banco de Olhos de Londrina, que apresenta um trabalho dedicado e de qualidade, representados por Fernando Pagotto Carneiro e Carlos Aparecido Oliveira.

Agradeço a todos que indiretamente ajudaram com a pesquisa: Sara Cristina, Murilo e Francielle Lesovski, Dr. Roberto Cacciari Filho, Dr. Neto Rosatelli.

Muito obrigado a todos.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:
Referências: adaptado de “*International Committee of Medical Journals Editors*” (Vancouver).
Universidade Estadual de Londrina. Divisão de Biblioteca e documentação.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com “*List of Journals Indexed in Index*”.

O artigo um intitulado: “**THREE-DIMENSIONAL HEADS-UP SURGERY FOR PRE-DESCEMET'S ENDOTHELIAL KERATOPLASTY GRAFT DISSECTION**” segue exigências de submissão do “*Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*”, disponível em “<https://www.springer.com/journal/417/submission-guidelines>”. Foram apresentados dados parciais deste artigo no Congresso “Association for Research in Vision and Ophthalmology” (ARVO) no ano de 2020, no formato de vídeo.

O artigo dois intitulado: “**DIGITAL MEASUREMENTS AND SCROLLING CHARACTERISTICS OF PRECUT ENDOTHELIAL KERATOPLASTY GRAFTS AFTER TRYPAN BLUE STAINING**” segue exigências de submissão do “*The Journal of Cornea and External Disease*”, disponível em <https://journals.lww.com/corneajrnl/Pages/informationforauthors.aspx>. Foram apresentados dados parciais deste artigo no Congresso “American Society Cataract and Refractive Surgery” (ASCRS) no ano de 2021, no formato de pôster eletrônico.

PRADO R. B. **Viabilidade celular, medidas digitais e características de rolagem de enxertos pré-cortados para ceratoplastia endotelial pré-Descemet pelo banco de olhos.** 2021. 85 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Objetivo: determinar a viabilidade celular, medidas digitais, e características de rolagem de enxertos pré-cortados para ceratoplastia endotelial pré-Descemet, e investigar a percepção de observadores sobre vídeos da técnica em duas e três dimensões (3D).

Desenho: estudo experimental com 49 botões corneoesclerais destinados ao descarte entre agosto de 2018 e setembro de 2020 pelo banco de olhos de Londrina.

Participantes: foram incluídas 47 córneas com densidade celular endotelial (DCE) acima de 2.000 células/mm² (cél./mm²), duas córneas foram excluídas por facectomia prévia.

Intervenção: dados de idade, sexo, diabetes mellitus, DCE, tempo entre óbito e preservação (TOP), tempo total preservação (TTP) foram coletados do prontuário do banco de olhos. Foram gravadas as disseções dos enxertos utilizando microscópio binocular (MB) ou o sistema cirurgia com cabeça erguida em 3D (CCE-3D) por conveniência. Os botões corneoesclerais foram dissecados por injeção de ar intraestromal e formação de grande bolha (GB). GB do tipo-1 e do tipo-3 foram cortadas com tesoura para ceratoplastia endotelial pré-Descemet (CEPD), e GB do tipo-2 foram esvaziadas e cortadas com trépano 8,25 mm para ceratoplastia endotelial da membrana de Descemet (CEMD) como grupo comparativo. O tempo do procedimento (TP), volume de ar injetado (VAI), e escore de rolagem (ER) foram determinados; quatro quadros selecionados do procedimento tiveram as medidas digitais obtidas no “FIJI-ImageJ”: distância branco a branco posterior (DBBP), diâmetro da GB (DGB), largura central do enxerto (LCE), LCE após coloração por azul de trypan (AT-LCE), comprimento do enxerto (CDE), área do enxerto (AE), e circularidade da margem do enxerto (CME). A correlação entre as variáveis foram analisadas por regressão linear, correlação de Pearson e o teste “*t student’s*”. Análise de viabilidade/citotoxicidade de enxertos representativos para CEPD foi realizada com microscópio confocal fluorescente, após tripla coloração com Hoeschst, ethidium-homodimer e Calcein AM. As imagens obtidas foram processadas no programa “FIJI-ImageJ” quanto à DCE e porcentagem de área viável (PAV). Dois vídeos editados da disseção em duas e 3D foram apresentados para oftalmologistas observadores e foi aplicado questionário comparativo sobre visibilidade das estruturas, qualidade da imagem, profundidade de foco, e capacidade de ensino. O valor de $P < 0,05$ foi estatisticamente significativo.

Resultados: A idade média dos doadores foi $53,85 \pm 14,5$ anos, 18 eram homens (66,6%), DCE média foi 2.376 ± 244 células/mm², TOP foi $14,48 \pm 8,83$ horas e TTP foi $36,56 \pm 25,64$ dias. Foram obtidos 24 enxertos para CEPD (51%), 17 para CEMD (36,2%), e seis falhas (12,8%). TP com CCE-3D foi $12,02 \pm 6,33$ min e com MB foi $13,55 \pm 5,05$ min ($P > 0,05$). TP para CEPD foi $12,5 \pm 5,7$ min e CEMD foi $4,7 \pm 4,1$ min ($P < 0,05$). Enxertos para CEPD e CEMD tiveram DBBP semelhantes ($P > 0,05$), as demais variáveis foram, significativamente, diferentes entre as duas modalidades

($P < 0,05$). LCE e AT-LCE de enxertos para CEPD foram $2,34 \pm 0,39$ e $2,39 \pm 0,363$ ($P = 0,29$), e para CEMD foram $1,95 \pm 0,41$ mm e $1,92 \pm 0,40$ ($P > 0,05$) respectivamente. Não houve alteração da ER após coloração por AT, CEPD apresentou ER-2 em 12/24 (50%), CEMB apresentou ER-3 em 12/17 (70,5%). LCE teve relação inversa com ER nas duas modalidades. Houve correlação linear positiva entre LCE e idade somente nos enxertos para CEMD. Enxertos para CEPD com CCE-3D tiveram DCE viável de 2.407 céls./mm² e DCE inviável de 37 céls./mm², com PAV de 80,1%. O questionário apresentou resultados superiores para CCE-3D em todos os itens questionados ($P < 0,05$).

Conclusão: viabilidade celular, medidas digitais, características de rolagem de enxertos para CEPD foram relatados pela primeira vez. A LCE para CEPD tem dimensões significativamente maiores que enxertos para CEMD, e não houve alteração significativa após coloração de AT. Imagens tridimensionais obtiveram melhores resultados em questionário comparativo da dissecação do enxerto.

Palavras-chave: ceratoplastia endotelial; banco de olhos; azul de tripano; imageamento tridimensional; distrofia endotelial de fuchs; perda das células endoteliais da córnea.

PRADO R. B. **Cellular viability, digital measurements, and scrolling characteristics of pre-Descemet endothelial keratoplasty precut grafts by the eye bank.** 2021. 85 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Purpose: to determine digital measurements, scrolling characteristics, and cell viability of precut grafts for pre-Descemet endothelial keratoplasty, and investigate the observers' perception about two and three dimensions (3D) technique videos.

Design: experimental study with 49 corneoscleral buttons destined for disposal between August 2018 and September 2020 by the Londrina Eye Bank.

Participants: 47 corneas were included with endothelial cell density (ECD) above 2,000 cells/mm², and two were excluded due to previous facetectomy.

Intervention: data on age, sex, diabetes mellitus, DCE, time between death and preservation (TDP), total preservation time (TPT) were collected from the eye bank chart. The grafts dissections were recorded using binocular microscope (MB) or 3D heads-up surgery (3D-HUS) system chosen for convenience. The corneoscleral buttons were dissected with intrastromal air injection and big bubble (BB) formation. Type-1 and type-3 GB were cut with scissors for pre-Descemet endothelial keratoplasty (PDEK), and type-2 BB were deflated and cut with an 8.25 mm trephine blade for Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK) as a comparative group. The procedure time (PT), injected air volume (AIV), and scrolling score were determined; four selected frames of the procedure had the digital measurements obtained in FIJI-ImageJ: posterior white-to-white distance (PWTWD), big bubble diameter (BBD), central graft width (CGW), CGW after trypan blue staining (TB-CGW), graft length (GL), graft area (GA) and graft margin circularity (GMC). The correlations between variables were analyzed by linear regression, Pearson's correlation and student's "t-test". Immunofluorescence analyses were performed using a confocal microscope, images were analyzed with FIJI-ImageJ, and three variables were calculated: viable and unviable ECD and viable area percentage (VAP). Two videos were edited with graft dissection images from 3D-HUS and BM, and both were presented to ophthalmologists who answered a comparative questionnaire. Paired samples were analyzed by t student's test, questionnaires answers were compared by U Mann-Whitney test, and P value <0.05 was statistical significant.

Results: the mean donor age was 53.85 ± 14.5 years, 18 male donors (66.6%), ECD was 2376±244 cells/mm², TDP was 14.48 ± 8.83 hours, and TPT was 36.56 ± 25.64 days. Were dissected twenty-four grafts for PDEK (51%) and 17 for DMEK (36.2%). Six (12.8%) had failed dissection and half were from diabetic donors. 3D-HUS dissection had procedure time (PT) of 12.02 ± 6.33 minutes and BM had PT of 13.55 ± 5.05 minutes (P>0.05). All variables except PWTWD showed a statistically significant difference between the PDEK and DMEK groups. CGW and TB-CGW were 2.344 ± 0.398 and 2.393 ± 0.363 respectively (P=0.293). Grafts for PDEK had SS-2 in 12 cases and for DMEK had SS-3 in 80%, and CGW had an inverse relationship with SS. There was a positive linear correlation between CGW and age only in DMEK grafts. Under PDEK conditions viable and unviable ECD were 2407

cells/mm² and 37 cells/mm² respectively. VAP was 80.1%. Questionnaire scores were higher in 3D-HUS in all items (P<0.05).

Conclusion: digital measurements, scrolling characteristics, and cellular viability for CEPD grafts were reported for the first time. CGW for PDEK grafts were significantly larger than DMEK grafts, and there were no significant changes after TB staining. The viability of PDEK grafts prepared using 3D-HUS was reported for the first time. Three-dimensional images obtained better results in a comparative questionnaire of graft dissection.

Key words: endothelial keratoplasty; eye bank; trypan blue; corneal endothelial cell loss; fuchs endothelial distrophy; three-dimensional imaging

LISTA DE TABELAS

ARTICLE 1

- Table 1** - Demographic parameters of donors and corneas included in data analysis45
- Table 2** - Mean scores of observers' questionnaire and interquartile range (IQR) for PDEK technique video using three-dimensional heads-up surgery (3D-HUS) and binocular microscope (BM)48

ARTICLE 2

- Table 1** - Demographics data of cornea donor tissue from eye bank records60
- Table 2** - PDEK and DMEK grafts mean values, standard deviation (SD) and P value of posterior white to white diameter (PWTWD), big bubble diameter (BBD), graft length (GL), graft area (GA), and graft margin circularity (GMC)62
- Table 3** - Mean values, standard deviation (SD) and P value of central graft width (CGW) before and after trypan blue staining (TB-CGW) according to scroll score (SS) for PDEK grafts.....65
- Table 4** - Mean values, standard deviation (SD) and P value of central graft width (CGW) before and after trypan blue staining (TB-CGW) according to scroll score (SS) for DMEK grafts66

LISTA DE FIGURAS

ARTICLE 1

- Figure 1** - Photograph of pre-Descemet endothelial keratoplasty graft dissection using three dimension heads-up surgery system45
- Figure 2** - Pre-Descemet endothelial keratoplasty graft with 20x objective lens of confocal microscope fluorescence analysis with triple staining. Viable endothelial cell density of 2407 cells/mm² stained with Hoechst 33342; unviable endothelial cell density of 37 cells/mm² stained with Ethidium-homodimer; green fluorescence of live cell cytoplasm stained with Calcein AM; three laser channels overlapping images46
- Figure 3** - Viability and cytotoxicity assay of Pre-Descemet endothelial keratoplasty graft and confocal microscope fluorescence. FIJI-ImageJ processed images with percentage bar graphic of stained cells in green by Calcein-AM and red by ethidium-homodimer (EH-1).....47
- Figure 4** - Pre-Descemet endothelial keratoplasty graft and confocal microscope fluorescence analysis. FIJI-ImageJ processed images with percentage bar graph of Hoechst 33342 stained cells and colocalization rate with Calcein-AM or ethidium-homodimer (EH-1).....47
- Figure 5** - Global graft viability assessment for pre-Descemet endothelial keratoplasty sample digitally mounted with nine juxtaposed images. Green fluorescence represents viable cells cytoplasm and dark areas are indicative of cellular dropout. Viable area percentage (VAP) was calculated with FIJI-ImageJ software by the relation of: a) graft area determined in original image in pixels; b) color threshold area selection of corresponding to green fluorescence.....48

ARTICLE 2

- Figure 1** - Four selected frames from recorded dissection video of Pre-Descemet endothelial keratoplasty (upper boxes) and

Descemet membrane endothelial keratoplasty (lower boxes) grafts. Digital measurements were obtained in FIJI-ImageJ software: white-to-white distance (PWTWD) (right diagonal; a,e); big bubble diameter (BBD) (left diagonal; a,e); graft length (GL) (vertical line; b,c,f,g); central graft width (CGW) (horizontal line; b,f); CGW after trypan blue staining (TB-CGW) (horizontal line; c,g); graft area (GA) (d,h); and graft margin circularity (GMC) (d,h)61

Figure 2 - Dispersion values, determination coefficient, and Pearson linear correlation of big bubble diameter (BBD) and posterior white-to-white distance (PWTWD) for PDEK grafts63

Figure 3 - Dispersion values, determination coefficient, and Pearson linear correlation of graft length (GL) and big bubble diameter (BBD) for PDEK grafts63

Figure 4 - Frequency of scroll score (SS) for PDEK and DMEK grafts64

Figure 5 - Dispersion values, determination coefficient, and Pearson linear correlation of central graft width (CGW) and age for PDEK and DMEK grafts67

Figure 6 - Dispersion, determination coefficient, and Pearson linear correlation of central graft width (CGW) before and after trypan blue staining (TB-CGW) for PDEK and DMEK grafts67

Figure 7 - Absolute frequency of diabetes mellitus and dissection status68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	micrômetro ou " <i>micrometer</i> "
DCE	densidade celular endotelial
ECD	" <i>endothelial cell density</i> "
céls./mm ²	células por milímetro quadrado
cells/mm ²	" <i>cells per square millimeter</i> "
CP	ceratoplastia penetrante
PK	" <i>Penetrating keratoplasty</i> "
CE	ceratoplastia endotelial
EK	" <i>endothelial keratoplasty</i> "
min	minutos ou " <i>minutes</i> "
CCE	camada de células endoteliais
ECL	" <i>endothelial cell layer</i> "
MD	membrana de Descemet
DM	" <i>Descemet's membrane</i> "
CPD	camada pré-Descemet
PDL	" <i>pre-Descemet's layer</i> "
nm	nanômetro ou " <i>nanometer</i> "
GB	grande bolha
BB	" <i>big bubble</i> "
CEDD	ceratoplastia endotelial com desnudamento da Descemet
DSEK	" <i>Descemet stripping endothelial keratoplasty</i> "
CEDAD	ceratoplastia endotelial com desnudamento automatizado da Descemet
DSAEK	" <i>Descemet stripping automated endothelial keratoplasty</i> "
CEMD	ceratoplastia endotelial da membrana de Descemet
DMEK	" <i>Descemet membrane endothelial keratoplasty</i> "
SSB	solução salina balanceada
BSS	" <i>balanced salt solution</i> "
CEPD	ceratoplastia endotelial pré-Descemet
PDEK	" <i>pre-Descemet endothelial keratoplasty</i> "
LCE	largura central do enxerto
CGW	" <i>central graft width</i> "
ER	escore de rolagem
SS	" <i>scroll score</i> "
AT	azul de tripano
TB	" <i>trypan blue</i> "

H	<i>"Hoechst 33342"</i>
CAM	<i>"Calcein AM"</i>
EH-1	<i>"Ethidium homodimer"</i>
MB	microscópio binocular
BM	<i>"binocular microscope"</i>
3D	três dimensões ou <i>"three dimension"</i>
CCE-3D	cirurgia com cabeça erguida em três dimensões
3D-HUS	<i>"three dimension heads-up surgery"</i>
TOP	tempo entre o óbito e preservação
DPT	<i>"death-preservation time"</i>
TTP	tempo total de preservação
TPT	<i>"total preservation time"</i>
TP	tempo de procedimento
PT	<i>"procedure time"</i>
DBBP	distância branco a branco posterior
PWTWD	<i>"posterior white-to-white distance"</i>
DGB	diâmetro da grande bolha
BBD	<i>"big bubble diameter"</i>
VAI	volume de ar injetado
AIV	<i>"air injected volume"</i>
CDE	comprimento do enxerto
GL	<i>"graft length"</i>
AT-LCE	LCE corado por azul de tripano
TB-CGW	<i>"trypan blue stained CGW"</i>
AE	área do enxerto
GA	<i>"graft area"</i>
CME	circularidade da margem do enxerto
GMC	<i>"graft margin circularity"</i>
µL	microlitro ou <i>"microliters"</i>
mm	milímetro ou <i>"millimeter"</i>
mm ²	milímetro quadrado ou <i>"square millimeter"</i>
PAV	porcentagem de área viável
VAP	<i>"viable area percentage"</i>
IIQ	intervalo interquartil
IQR	<i>"interquartile range"</i>
<	menor que ou <i>"less than"</i>
DP	desvio padrão

SD	<i>“standard deviation”</i>
±	mais/menos ou <i>“plus/minus”</i>
R ²	coeficiente de correlação ou <i>“correlation coefficient”</i>
EUA	Estados Unidos da América
USA	<i>“United States of America”</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	APRESENTAÇÃO	18
1.2	LAMELA POSTERIOR DA CÓRNEA	19
1.2.1	Anatomia e Fisiologia	19
1.2.2	Camada de Células Endoteliais	19
1.2.3	A Membrana de Descemet	20
1.2.4	A Camada Pré-Descemet	21
1.2.5	O Estroma da Córnea	21
1.3	CERATOPLASTIA ENDOTELIAL	21
1.3.1	Modalidades de Ceratoplastia Endotelial	21
1.3.2	Características da Lamela Posterior	24
1.3.3	Avaliação da Viabilidade Celular Endotelial	25
1.3.4	Microscópios Cirúrgicos	26
1.3.5	Papel do Banco de Olhos	27
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	DESENHO DO ESTUDO	31
4.2	DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	31
4.3	TRIPLA COLORAÇÃO E MICROSCOPIA CONFOCAL FLUORESCENTE	32
4.4	PROCESSAMENTO DAS IMAGENS	33
4.5	VARIÁVEIS COLETADAS	33
4.6	QUESTIONÁRIOS	34
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1	RESULTADOS	35
5.2	ARTICLE 1	36
5.3	ARTICLE 2	52

6	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	81
	ANEXO A - FOLHA DE ROSTO ENVIADA À PLATAFORMA BRASIL ..	81
	ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	82
	ANEXO C - NORMAS PARA DISSERTAÇÃO OU TESE.....	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

A córnea e o cristalino representam as duas lentes do sistema óptico do olho, que realizam a refração da luz do ambiente externo para a retina, sendo a primeira responsável por dois terços de todo o poder refracional. A transparência da córnea ocorre por se tratar de um tecido avascular, que recebe o aporte de oxigênio do ambiente externo diluído no filme lacrimal, e o aporte metabólico provém do humor aquoso. Composta basicamente por colágeno, a córnea apresenta espessura média central de 550 micrômetros (μm) e periférica de $662 \mu\text{m}^1$, seu formato elíptico resulta em maior curvatura na região central do eixo visual com ceratometria média de 42,87 dioptrias².

Ao nascimento a densidade celular endotelial (DCE) apresenta os maiores valores e se observa a redução importante, conforme o tecido corneano cresce³, decaindo para 2.300 células por milímetros quadrados (cél./mm^2) na idade adulta e 1.600cél./mm^2 nos idosos⁴. As células endoteliais não se proliferam “*in vivo*” o suficiente para permitir a regeneração desta camada, sendo assim, pacientes com DCE entre 700 e 400cél./mm^2 apresentam hidratação do estroma da córnea, que resulta em opacidade tecidual com aparecimento de bolhas no epitélio⁵. O transplante de córnea restaura a transparência do tecido, transferindo a DCE de um doador cadáver para um receptor, que deverá manter as condições ideais para a sobrevida do enxerto.

As principais doenças que cursam com falência endotelial são distrofia endotelial de Fuchs e ceratopatia bolhosa do pseudofácico. Portadores dessas patologias realizavam como única opção terapêutica a ceratoplastia penetrante (CP), que substitui a córnea do receptor por um enxerto de espessura total. Porém, o desenvolvimento de transplantes lamelares permite hoje a substituição seletiva das camadas posteriores doentes por enxertos endoteliais, que preservam grande parte da córnea receptora. Observa-se crescente número de relatos de sucesso de ceratoplastias endoteliais (CE) na literatura médica⁶⁻¹⁰, essas técnicas apresentam resultados visuais mais previsíveis com incisão de tamanho reduzido, no entanto, a longa curva de aprendizado representa uma desvantagem. A manipulação excessiva do enxerto, no preparo e abertura intraocular, é responsável por significativa perda de células endoteliais, esse dano impacta na sobrevida do transplante resultando em falência da córnea¹⁰.

Nesse cenário, o banco de olhos possui extrema importância no desenvolvimento de técnicas de preparo e de distribuição de enxertos pré-cortados com objetivo de garantir a qualidade e a segurança para os receptores. Atualmente, banco de olhos internacionais disponibilizam enxertos pré-cortados para CE, diminuindo a complexidade e a duração dos

transplantes lamelares. Entretanto, no Brasil, a dissecação da córnea para CE é realizada pelo próprio cirurgião antes da indução anestésica do receptor. Isso resulta em maior tempo de uso da sala cirúrgica e maior estresse do procedimento, uma vez que a falha da dissecação do tecido resulta na suspensão do procedimento cirúrgico. Este estudo descreve a experiência de um banco de olhos no preparo de enxertos endoteliais com córneas destinadas ao descarte.

1.2 LAMELA POSTERIOR DA CÓRNEA

1.2.1 Anatomia e Fisiologia

As camadas posteriores da córnea apresentam características anatômicas e fisiológicas distintas e o estudo da composição e do comportamento da lamela posterior contribui para o desenvolvimento dos transplantes lamelares de córnea. Certamente, o principal objetivo de um transplante de córnea é a substituição da camada de células endoteliais (CCE) com boa viabilidade, esta possui como membrana basal a membrana de Descemet (MD). Seguindo de posterior para anterior a camada pré-Descemet (CPD) separa a MD do estroma da córnea.

1.2.2 Camada de Células Endoteliais

As células endoteliais possuem formato hexagonal e apresentam forte adesão intercelular, organizam-se na forma de um epitélio de camada única derivado da migração e diferenciação de células da crista neural¹¹. O olho humano apresenta crescimento, principalmente, nos seis primeiros meses de vida; e experimenta o aumento do comprimento axial, a diminuição da ceratometria média, e o aumento da distância branco a branco^{11,12}. Com o crescimento da córnea ocorre diminuição da DCE e se observa a hipertrofia da CCE em humanos e outros mamíferos¹³.

Um denso pacote de células endoteliais manifesta a inibição de contato que realiza regulação positiva de inibidor de quinase ciclina dependente, que impede a transcrição para a fase-S da mitose, isso mantém as células presas na fase G1 do ciclo celular¹⁴⁻¹⁶. Apesar de não haver evidências da multiplicação de células endoteliais "*in vivo*", em laboratório isto foi possível com base neste conhecimento molecular¹⁷. "*In vivo*", a perda localizada de células endoteliais possui dois mecanismos de reparo pelas células vizinhas: o alargamento observado pelo aumento da área celular (polimegatismo) e o deslizamento evidenciado pela diminuição da porcentagem de células hexagonais (polimorfismo). Foram relatados DCE de 6.500 cél./mm² no primeiro mês de vida¹³, declínio na infância com valores médios de 3.500

cél./mm² aos cinco anos de idade¹⁸, e 2.300 cél./mm² aos 85 anos de idade¹⁹. De maneira geral, a DCE sofre redução na ordem de 0,6% a cada ano em córneas normais²⁰.

O aporte metabólico da córnea provém do humor aquoso e esse mecanismo é desempenhado pelas células endoteliais, que possuem grande número de mitocôndrias¹⁵. A hipótese do vazamento e bomba ativa explica como o endotélio da córnea consegue permitir o influxo de metabólitos essenciais contidos no humor aquoso e, ao mesmo tempo, manter a baixa hidratação do estroma²¹. As células endoteliais se encontram fortemente unidas por um cinto incompleto ou "*zonnulla ocludens*", que forma uma barreira ao humor aquoso, mas permite o vazamento passivo do fluido. De maneira contrária, as células endoteliais possuem bombas de íons Na⁺/K⁺ que criam gradiente de osmolaridade e devolvem o líquido para a câmara anterior.

1.2.3 A Membrana de Descemet

No período fetal, a MD apresenta rápido crescimento em espessura, e de uma fina e ordinária membrana basal se diferencia em uma estrutura lamelar constituída por 30 camadas ao final da gestação. Apresenta um padrão de bandas de colágeno dispostos em periodicidade de aproximadamente 110 nanômetros (nm) entre as fibras²². No período pós-natal se observa aumento de espessura de três µm ao nascimento para 18 µm aos 98 anos. Esse crescimento ocorre durante a vida, de uma maneira exponencial, pela deposição de material não lamelar, posteriormente, à membrana pré-natal original²³. Um estudo analisou a quantidade e a distribuição de elastina nos tecidos oculares e demonstrou duas porções distintas na MD, o segmento anterior fetal apresentou quantidade elevada de elastina, enquanto a porção posterior e pós-natal apresentou quantidades menores e distribuição difusa²⁴.

A MD representa a membrana basal da CCE, e o conjunto formado por essas duas camadas resultam em uma superfície posterior da córnea lisa e com concavidade regular, tanto a curvatura anterior como a curvatura posterior da córnea atuam, significativamente, nos resultados refracionais dos olhos²⁵. A MD se mostra permeável à passagem bidirecional de líquidos e de nutrientes provenientes do humor aquoso por pequenos poros entre as matrizes de colágeno, isso garante o aporte nutricional das células do estroma da córnea. Essa camada possui capacidade regenerativa restrita a pequenos danos e se observa o influxo de líquidos entre as fibras de colágeno nos danos mais extensos²⁶, resultando em fibrose do estroma da córnea e diminuição da transparência tecidual.

1.2.4 A Camada Pré-Descemet

A descoberta da CPD redefiniu a anatomia humana da córnea e foi descrita por Dua e colaboradores, em 2013²⁷. Os autores observaram que uma grande bolha (GB) se formava por injeção de ar no estroma na córnea, que não se esvaziava mesmo após a retirada da MD. A forte aderência da CPD com a MD, na média periferia da córnea limita as dimensões dessa bolha central com diâmetro reduzido. Trata-se de uma delgada camada elástica de espessura entre seis e 15 μm , composto por cinco a oito lamelas de colágeno compacto²⁸, que por ser impérvia ao ar possibilita um plano de clivagem por injeção de ar no estroma da córnea. Apresenta resistência tecidual que suporta a pressão criada pela GB, isso ocorre em função da elevada quantidade de elastina que possui distribuição regular por todo o tecido²⁴. A presença de defeitos setoriais da CPD explica a ocorrência de descemetocèle e hidropsia da córnea observada em pacientes com diagnóstico de ceratocone avançado, nesses casos, o influxo de humor aquoso no estroma resulta em perda da transparência tecidual com opacidade do eixo visual.

1.2.5 O Estroma da Córnea

O estroma constitui a camada mais espessa da córnea, conferindo resistência e proteção aos olhos. Como resultado do espaçamento regular e do diâmetro uniforme entre as fibras de colágeno, esta camada possui transparência óptica mesmo com a presença de células e matriz extracelular. Os ceratócitos são as células responsáveis pela produção de colágeno e de glicosaminoglicanos que compõe a matriz extracelular, e todo esse conjunto desempenha papel importante para a manutenção da homeostase da córnea²⁹.

1.3 CERATOPLASTIA ENDOTELIAL

1.3.1 Modalidades de Ceratoplastia Endotelial

Técnicas seletivas de CE substituíram a CP como principal modalidade de tratamento para doenças das camadas posteriores da córnea. Ainda há discordâncias quanto à perda celular endotelial e a sobrevida do enxerto na comparação entre CE e CP. Dados de um grande centro oftalmológico, com alto volume cirúrgico, sugerem que a perda celular e a sobrevida de enxertos endoteliais se aproximam dos números citados para CP³⁰. Outro estudo apresentou dados que sugerem melhores resultados para CP, assim, se estabeleceu uma correlação entre a DCE do doador e a sobrevivência do enxerto³¹. A

extrapolação de dados da CP foi utilizada para derivar um valor mínimo de DCE necessário para sobrevida do enxerto, os bancos de olhos adotaram o valor de 2.200 céls./mm² como ponto de corte para uso de tecido doador no transplante³².

A hipotonia após a enucleação do globo ocular e a manipulação da córnea para dissecação produzem dobras estromais que, frequentemente, são desprovidas de células endoteliais^{33,34}. Além disso, danos endoteliais iatrogênicos ocorrem em todas as fases da captação, armazenamento³⁵, dissecação³⁶, trepanação³⁷, inserção³⁸, e sutura³⁹.

As camadas da córnea contidas na lamela posterior transplantada determinam o nome da modalidade de CE, diversas técnicas têm sido descritas e cada uma difere da outra pela maneira como o enxerto foi preparado^{40,41}. De modo geral, todas essas são superiores à CP, quanto a melhor reabilitação visual, mínima alteração do poder refrativo da córnea, mínimo astigmatismo induzido, eliminação de complicações induzidas por sutura ou deiscências, e menor taxa de rejeição^{42,43}.

O primeiro relato da modalidade de CE, no ano de 1956, por Charles Tillett⁴⁴ descreveu a sutura de um botão posterior no leito receptor, porém foi a técnica de Gerrit Melles et al., em 1998, que popularizou essa modalidade ao injetar uma bolha de ar na câmara anterior para adesão do botão doador ao leito receptor⁴⁵. Após, Prince et al. descreveram a ceratoplastia endotelial com desnudamento da Descemet (CEDD), na qual a retirada seletiva da MD com endotélio do receptor facilitou a adesão do enxerto e tornou a técnica mais reprodutível⁴⁶. Crescentes relatos de sucesso em CE foram descritos posteriormente, com o benefício de substituir somente as camadas doentes da córnea⁴⁵⁻⁴⁷.

A técnica ceratoplastia endotelial com desnudamento automatizado da Descemet (CEDAD) se tornou a CE mais realizada nos Estados Unidos da América (EUA) por apresentar boa reprodutibilidade, padronização do corte e fácil abertura intraocular do enxerto⁴⁸. Nesta modalidade se utiliza um microcerátomo automatizado para confeccionar uma lamela posterior^{49,50} com um fino estroma residual aderido à MD, que permite a utilização de córneas de doadores de todas as idades⁵¹. Porém, em microscopia eletrônica se demonstrou que os cortes com o microcerátomo no estroma não são uniformes, circulares e concêntricos⁵², e a soma de tecido pode induzir hipermetropia no pós-operatório⁵³⁻⁵⁵. Outros fatores que limitam a universalização do CEDAD são os custos com o microcerátomo, principalmente, nos países subdesenvolvidos.

Uma nova modalidade de CE, a ceratoplastia endotelial da membrana de Descemet (CEMD), foi introduzida por Melles, em 2006, na qual uma lamela posterior mais próxima do ideal, contendo somente MD e CCE foi transplantada⁵⁶. Essa técnica apresenta como benefício, em relação ao CEDAD, a promoção de rápida e completa reabilitação visual^{47,50}. Com um enxerto fino de 8-10 µm de espessura a CEMD representa a atual tendência dos oftalmologistas entre as CE⁵⁷. O estroma residual é extinto diminuindo a ocorrência de

rejeição^{43,58}, e a dissecação manual do enxerto reduz os custos da cirurgia. Porém, a execução da técnica cirúrgica com uma lamela posterior muito fina apresenta uma longa curva de aprendizado^{56,59}. Por esses motivos, oftalmologistas realizam treinamento em córneas destinadas ao descarte para o desenvolvimento de habilidades cirúrgicas.

O preparo de enxertos para CEMD utiliza como técnica padrão o desnudamento da DM com uma pinça atraumática, mantendo o enxerto submerso em solução salina balanceada (SSB) ou em meio de preservação para evitar o secamento⁶⁰. O toque da pinça na CCE ocorre na periferia do enxerto e após realização de 80-90% da separação, a lamela posterior retorna à posição original e se procede à trepanação no tamanho desejado. Em um estudo comparativo entre cinco técnicas para CEMD, essa técnica de preparo apresentou as menores perdas de células endoteliais⁵². Observa-se forte aderência da MD em doadores com idade inferior a 50 anos, impedindo a realização do desnudamento da membrana, isso limita a quantidade de doadores disponíveis para CEMD⁶¹. Ainda, foram relatadas técnicas de dissecação da lamela posterior com formação da GB por injeção de líquidos^{62,63} ou viscoelático⁶⁴.

No entanto, foi a injeção de ar intraestromal que revolucionou os transplantes lamelares de córnea. Primeiramente, a técnica cirúrgica ceratoplastia anterior lamelar profunda descreveu a formação de uma GB de ar que permitiu a substituição seletiva da lamela anterior⁶⁵ mantendo-se o complexo MD e CCE do receptor. Busin et al. descreveram a aplicação da mesma técnica na obtenção da lamela posterior para CEMD⁶⁶. Observando os resultados da injeção de ar intraestromal é possível identificar dois tipos distintos de GB.

A GB do tipo-1 possui menor diâmetro e inicia sua formação pelo centro, as paredes são formadas pela CPD, MD e CCE. A GB do tipo-2 possui maior diâmetro e inicia sua formação pela periferia, as paredes são formadas pela MD e CCE. A formação de um padrão misto entre a GB do tipo-1 e do tipo-2 recebe o nome de GB do tipo-3.

Enxertos que formaram GB do tipo-1 ou do tipo-3 possuem como parede anterior a CPD e apresentam espessura média de $28,0 \pm 5,6 \mu\text{m}$ em tomografia de coerência óptica. No primeiro relato de CE com enxerto dissecado por injeção intraestromal de ar e GB do tipo-1 foi realizado por Agarwal *et al.* e recebeu a denominação de ceratoplastia endotelial pré-Descemet (CEPD)⁶⁷. Essa modalidade de transplante possui os mesmos benefícios que CEMD, porém a diferença no método de dissecação possibilita a obtenção de enxertos de doadores de todas as idades. A possibilidade de transferência da DCE elevadas que caracterizam as córneas de jovens empolgou os cirurgiões de córnea pelo aumento da quantidade de possíveis doadores para CE.

Foi demonstrado, recentemente, que o ar injetado no estroma da córnea segue um caminho consistente, independentemente, da localização, direção do bisel, e a profundidade da ponta da agulha⁶⁸. A dissecação com ar cria um plano de clivagem, que separa a CPD do

estroma da córnea, a CCE que em seu estado natural possui o formato côncavo, após a formação da GB assume o formato convexo e com o esvaziamento retorna à posição original. Certamente, essas mudanças de conformação resultam em diminuição da DCE, as córneas que tiveram formação da GB do tipo-2 apresentaram perda celular, significativamente, maior em comparação com córneas que formaram a bolha do tipo-1⁶⁹. Provavelmente, a maior espessura da lamela posterior e o menor tamanho da bolha que os enxertos para CEPD apresentam expliquem essa diferença na perda celular em comparação com enxertos para CEMD. Um instrumento em forma de “*clamp*” foi projetado para ocluir as fenestrações na periferia da CPD, e assim evitar a formação da GB do tipo-2. Relataram taxa de sucesso na formação de GB do tipo-1 em 100% das vezes com o uso do “*clamp*”⁷⁰, assim, esse instrumento garante maior segurança aos bancos de olhos no preparo de enxertos pré-cortados para CEPD.

1.3.2 Características da Lamela Posterior

Tanto enxertos lamelares para CEMD como para CEPD, quando submersos em solução aquosa apresentam a tendência de se enrolarem com a face endotelial voltada para fora. Mohamed et al., em 2018, utilizando marcadores celulares demonstraram a presença de maior quantidade de elastina na banda anterior pré-natal da MD em comparação com o segmento posterior formado, em sua maioria, por colágeno. Sendo assim, a concentração de elastina na região anterior força o tecido a se enrolar como um pergaminho com a face posterior para fora, e essa característica foi mantida mesmo após a retirada das células endoteliais. Outro dado importante deste estudo foi reversão da tendência de se enrolar do enxerto, após a aplicação de substância enzimática digestora de elastina²⁴.

A medida da largura central do enxerto (LCE) representa e quantifica a tendência dos enxertos de se enrolarem, assim, menores valores de LCE representam enxertos apertados, enquanto maiores valores representam enxertos frouxos. Outra informação importante descreve o escore de rolagem (ER) da secção transversal do enxerto submerso em líquido, descrito originalmente em língua inglesa como “*Scroll Score*”: ER-1 - as margens do enxerto não se tocam; ER-2 - as margens se tocam; ER-3 - forma-se um rolo frouxo; ER-4 - forma-se um rolo com múltiplas voltas ou dois rolos apertados⁶¹.

Esses dados podem prever o grau de dificuldade que o cirurgião encontrará para realizar a abertura intraocular do enxerto⁷¹, e como o trauma cirúrgico é responsável pela queda significativa da DCE no pós-operatório, a LCE e ER representam informações importantes no processamento do tecido pelo banco de olhos⁷².

Observa-se que a LCE possui relação direta com a idade do doador⁷¹, esse fato ocorre em função de secreção constante de colágeno pelas células endoteliais durante a

vida, que resulta no aumento da espessura da banda posterior da MD. Enxertos para CEPD apresentam uma camada adicional de dez μm anteriormente ao complexo MD e CCE, a soma da CPD estabiliza, parcialmente, as forças elásticas da banda anterior fetal da MD, e ainda em função da distribuição uniforme de elastina a CPD não se enrola⁷³. Enxertos para CEPD apresentam menor tendência de se enrolar quando comparado com aqueles para CEMD, e essa característica facilita a abertura intraocular e a centralização desses enxertos.

O sucesso da CE depende de várias etapas do procedimento desde a dissecação até a aderência ao leito receptor, em todas essas a visibilização das margens e a configuração do enxerto são de extrema importância. Rotineiramente se utiliza um corante vital como o azul de tripano (AT) para essa finalidade, um estudo demonstrou que a impregnação do corante no tecido permanece por horas e não foi observada perda celular endotelial significativa⁷⁴. Percebe-se na prática cirúrgica maior facilidade de abertura intraocular em enxertos, que foram submersos em solução de AT, e para corroborar com isso, um estudo com microscópio de forças atômicas demonstrou o aumento da rigidez de fragmentos da MD corados por AT, quando comparado ao grupo controle não corado ($P < 0,001$)⁷⁵. Com o aumento da rigidez das membranas se pode esperar alterações das medidas de LCE e ER após a coloração por AT, porém não se encontra na literatura médica estudos sobre os efeitos da coloração por AT em enxertos endoteliais.

1.3.3 Avaliação da Viabilidade Celular Endotelial

O objetivo do transplante lamelar posterior de córnea é transferir a DCE do enxerto doador para o receptor, e diversos métodos podem ser empregados para analisar a viabilidade de um enxerto. A maneira mais comum para se determinar a DCE é a microscopia especular, que calcula a relação entre a contagem de células pela área analisada. Por ser de fácil execução, esse método foi adotado pelos bancos de olhos, informando ao médico transplantador a DCE do enxerto oferecido, porém outros dados como dobras na MD e alterações epiteliais complementam as informações coletadas no processamento pelo banco de olhos.

Com frequência, estudos experimentais utilizam a coloração por AT para determinar a porcentagem de áreas de exclusão coradas pelo corante de membrana basal, a submersão do endotélio em uma solução de sucrose 4% auxilia na determinação das margens das células endoteliais^{66,74,76}. Outro método utiliza a coloração por alizarina vermelha para destacar os limites celulares da CCE, a maior nitidez dos limites celulares auxilia na contagem celular e destaca em preto as áreas com células inviáveis⁷⁷. Esse método possui limitações, uma vez que a coloração com AT subestima, sistematicamente, a

mortalidade das células endoteliais no reconhecimento de células em apoptose, e as células mortas individuais podem não ser reveladas pela fotografia macroscópica padrão⁷⁴. Áreas menores e não contíguas de células mortas podem ser incluídas, incorretamente, em áreas macroscopicamente viáveis. Além disso, a determinação da viabilidade de lamelas posteriores com formato de pergaminho é de difícil realização e se dá na maioria das vezes por comparações macroscópicas. A extrapolação de pequenos campos centrais de alta potência para estimativas globais de DCE possuem o risco de viés de amostragem, a quantidade de células aumentam nas regiões periféricas, e a perda celular não é uniforme em todo o tecido^{62,78}.

Pipparelli et al. apresentaram um método experimental com avaliação global do enxerto por técnica de tripla marcação endotelial e análise da emissão de fluorescência⁷⁹, esse método apresentou de forma mais fiel as reais condições de viabilidade e citotoxicidade de todo o tecido. Os pares de bases nitrogenadas adenina e timina do material de cromatina marcado com o corante vital nuclear Hoechst (H), quando excitados por luz ultravioleta de 350 nanômetros (nm) emitem fluorescência azul/ciano com pico de 461nm. A Calceína AM (CAM) é um composto não fluorescente hidrofóbico que facilmente permeia células vivas intactas e quando hidrolisado por esterases intracelulares de células vivas transformam-se em um produto hidrofílico que emite fluorescência verde com pico de 520 nm quando excitadas por luz a 495 nm. Etidium-homodimer (EH-1) produz marcação do ácido nucléico em núcleos de células com as membranas comprometidas, sendo que este marcador emite fluorescência vermelha com pico de 617 nm quando excitado por luz a 528 nm. A captação da fluorescência emitida pelas células é realizada com um microscópio confocal, que permite obtenção de imagens para determinação da DCE e imagens globais do enxerto para o cálculo da porcentagem de área viável (PAV).

Mesmo os métodos de avaliação global da córnea ignoram o viés do efeito da curvatura posterior da córnea, ou realizam incisões radiais para aplanar o tecido^{35,79}. Um estudo demonstrou método de avaliação global do enxerto utilizando uma base côncava customizada para combinar com a curvatura do tecido⁸⁰, isso permitiu análise de viabilidade endotelial sem a realização de cortes adicionais.

1.3.4 Microscópios Cirúrgicos

Para visualizar as imagens com excelente resolução, profundidade, clareza, e contraste, o cirurgião utiliza ao menos um microscópio binocular (MB) em procedimentos oftalmológicos, e da mesma forma para o preparo de enxertos em banco de olhos, este auxílio óptico se torna indispensável. O movimento dos olhos dentro dos limites impostos pelas oculares dos MB permite a inspeção do campo cirúrgico, mantendo o pescoço e a

cabeça em uma posição fixa. Uma nova tecnologia possibilita ao cirurgião e toda equipe utilizando óculos polarizados, visualizar as imagens do microscópio em uma tela de 55 polegadas com alta definição, esse sistema foi chamado de cirurgia com cabeça erguida em 3D (CCE-3D), tradução da língua inglesa para “*three dimension heads-up surgery*”. Um sistema com duas câmeras de alta faixa dinâmica conectada ao microscópio cirúrgico apresentam imagens com baixa latência, ocorre um atraso de 71 milésimos de segundo entre o movimento da mão do cirurgião e a imagem na tela⁸¹. Com o sistema de visualização digital, CCE-3D foram relatados ganho de profundidade de foco com iluminação reduzida e melhor ergonomia em comparação ao MB⁸².

O sistema CCE-3D foi recebido com entusiasmo entre os oftalmologistas de retina e vítreo, uma vez que se observa melhora da visualização nas cirurgias do segmento posterior⁸²⁻⁸⁴. Ainda, foram relatados procedimentos do segmento anterior com CCE-3D como facectomia com implante de lente intraocular, CEDAD e CEMD⁸⁵⁻⁸⁷. O presente estudo possibilitou ao banco de olhos de Londrina utilizar o sistema de CCE-3D para produção de enxertos endoteliais, não foram encontrados relatos prévios da produção de vídeos da dissecação de enxertos para CEPD, em três dimensões com emprego dessa tecnologia para banco de olhos.

1.3.5 Papel do Banco de Olhos

Técnicas seletivas de CE substituíram a CP como principal modalidade de tratamento para doenças das camadas posteriores, e essa crescente preferência resultou no desenvolvimento e aprimoramento das ações nos bancos de olhos. O fornecimento de tecidos processados para CE remove o principal risco de perda do tecido doador em sala de cirurgia, além disso, diminui a complexidade cirúrgica do transplante e oferece maior controle de qualidade do enxerto^{87,89}. Exemplos disso incluem a distribuição de tecidos doadores pré-cortados com microcerátomo para CEDAD^{90,91}, enxertos pré-montados para CEDAD prontos para injeção intracamerar^{92,93}. Recentemente, a distribuição de enxertos pré-cortados, pré-montados e pré-carimbados para CEMD tornaram essa modalidade de transplante mais fácil e segura⁹⁴⁻⁹⁶. Dois estudos relataram resultados visuais semelhantes em pacientes, que receberam córneas preparadas para CEMD pelo cirurgião, na sala de cirurgia, ou previamente pelo banco de olhos^{49,72}.

Bancos de olhos internacionais realizam o processamento e a distribuição de tecidos pré-cortados, pré-corados, pré-carimbados e pré-montados para CEDAD, CEMD e, recentemente, para CEPD; essa prática ainda não foi descrita por bancos de olhos do Brasil. Apesar do alto número de possíveis doadores existe uma escassez global de enxertos⁹⁷, estima-se que em todo mundo uma córnea é disponibilizada para cada 70 córneas

necessárias, e alguns países ainda não possuem acesso a tecidos aptos para o transplante⁹⁸. Isso motivou estudos que demonstraram aceitável viabilidade celular endotelial para o transplante de enxertos pré-montados após 96 horas de distribuição, permitindo a entrega de tecidos prontos para o transplante, mesmo em países diferentes⁹⁹.

O banco de olhos entrega ao cirurgião o enxerto dentro de um frasco de vidro ou cartucho de plástico, que pode ser distribuído, em formato original, com o endotélio para fora ou ser manualmente dobrado com o endotélio para dentro, manobra que teoricamente previne o toque nas paredes do frasco. Um estudo encontrou perdas de células endoteliais semelhantes entre os dois tipos de recipientes e entre as maneiras como o enxerto foi dobrado¹⁰⁰.

2 JUSTIFICATIVA

Enxertos para CEMD foram amplamente estudados e, atualmente, representam a técnica padrão ouro para transplantes endoteliais, porém a principal limitação dessa modalidade constitui a idade do doador acima de 50 anos, que limita a quantidade de possíveis doadores e, ao mesmo tempo, previne a obtenção de enxertos com ER apertados. Enxertos para CEPD apresentam como benefícios sobre CEMD a possibilidade de obtenção de enxertos endoteliais em doadores de todas as idades, e ainda a presença da CPD anteriormente à MD resulta em tecidos com ER menores. No entanto, enxertos para CEPD possuem técnicas de preparo, armazenamento e distribuição diferentes de CEMD e poucos estudos foram encontrados sobre essa nova técnica. Apesar da coloração por AT ser rotineiramente empregada para enxertos endoteliais não há relatos sobre os efeitos do corante nas dimensões e ER de enxertos para CEPD e CEMD. Com o objetivo de atenuar a curva de aprendizado das técnicas de preparo de enxertos para banco de olhos se justifica o emprego do sistema CCE-3D para edição de vídeos demonstrativos da técnica cirúrgica com imagens estereoscópicas, e para isso se optou por examinar previamente a viabilidade de tecidos destinados ao descarte.

3 OBJETIVOS

- Determinar a PAV e a DCE de enxertos para CEPD preparados com CCE-3D;
- Investigar a percepção de oftalmologistas observadores sobre vídeos do preparo de enxertos para CEPD em duas e três dimensões;
- Comparar medidas digitais e ER de enxertos endoteliais para CEPD e CEMD antes e após a coloração por AT.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi desenhado um projeto piloto para estudo experimental, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina com número do parecer 2.799.149. Houve também aprovação da pesquisa pelo Comitê de Análise de Projetos Científicos do Hospital Universitário de Londrina, segundo o processo de número 234.2020. O termo de consentimento livre esclarecido foi dispensado por ter sido firmado no trâmite da doação de órgãos. Um cirurgião oftalmologista (Oguido A.P.T.M.) com experiência e certificação pela Associação Pan-Americana de Banco de Olhos realizou a dissecação de enxertos lamelares para CE por dissecação com injeção de ar. Foram utilizados dois tipos de sistema de visibilização do microscópio cirúrgico: CCE-3D microscópio cirúrgico da marca Leica, modelo M822 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado ao sistema de visibilização “Ngenuity” (Alcon, Fort Worth, EUA) e a plataforma “True Vision” (TrueVision, Santa Barbara, EUA); e MB da marca Zeiss, modelo OPMI VISU 160 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

O banco de olhos de Londrina disponibilizou para pesquisa 49 botões corneoesclerais humanos destinados ao descarte no período de agosto de 2018 a julho de 2020. Um termo de responsabilidade do pesquisador foi firmado garantindo a devolução do tecido para o descarte rotineiro. Foram incluídos no estudo tecidos que apresentavam DCE acima de 2.000 células/mm² em exame com microscópio especular (Konan, Nishinomiya, Japão). As córneas de doadores com história prévia de glaucoma, cirurgia intraocular ou uveíte foram excluídas da análise pelo potencial de lesão dessas patologias a CCE.

4.2 DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os discos corneoesclerais medindo, aproximadamente, 12 milímetros (mm) em meio de preservação Optisol-GS (Baush & Lomb, Irvine, EUA) sob temperatura controlada de 4°C foram encaminhadas ao centro cirúrgico, uma hora antes do procedimento foram mantidas sob temperatura ambiente (23°C). O procedimento cirúrgico foi registrado por gravação em vídeo de alta resolução no formato “avi”. A córnea doadora foi posicionada sobre uma base de trepanação com a face posterior voltada para cima. Sobre a face endotelial foi instilado 0,1 mililitros de 0,1% AT (Ophthalmos - São Paulo, Brasil) e após 30 segundos o corante foi removido. Uma seringa de cinco centímetros cúbicos (cm³) acoplada em uma agulha de 30 “gauges” foi introduzida sobre a linha de “Schwalbe” com o bisel voltado para cima até

alcançar a região central e posterior do estroma da córnea. Procedeu-se a dissecação da córnea por injeção intraestromal de ar até a formação completa de uma GB, e dois grupos foram formados de acordo com o tipo de bolha obtido: Grupo CEPD - formação de GB tipo-1 ou tipo-3; Grupo CEMD - formação de GB tipo-2. Um compasso calibrado em três milímetros foi apresentado no plano da córnea com a bolha inflada para obtenção do primeiro quadro das medidas digitais.

Enxertos para CEPD tiveram a dissecação realizada com bisturi 15 graus e tesoura “*Vannas*”, enquanto que, enxertos para CEMD foram cortados por trépano de 8,25 mm da marca Katena (New Jersey, EUA). Procedeu-se a marcação com um carimbo “S” por via anterior após a realização de “*punch*” de três milímetros. O segundo e terceiro quadro do enxerto submerso em SSB foram obtidos, antes e após coloração por AT por cinco minutos. O enxerto foi submerso em solução de paraformaldeído 4% em uma placa “*CellView*” e se procedeu a abertura do tecido sobre um papel filtro utilizando uma espátula romba com gotejamento de SSB e secagem com esponja, para obtenção do quarto quadro com o enxerto aberto.

4.3 TRIPLA COLORAÇÃO E MICROSCOPIA CONFOCAL FLUORESCENTE

Por serem inéditos na literatura, enxertos representativos de CEPD preparados com CCE-3D foram selecionados para análise de viabilidade no Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas da Universidade Estadual de Londrina com um microscópio confocal espectral modelo TCS SP8A (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). O enxerto foi lavado por cinco ciclos de gotejamento de BSS e absorção com esponja, e seguindo descrição prévia⁷⁹, foi realizado ensaio de imunofluorescência com incubação de tripla coloração para células de mamíferos, em ambiente escuro, com temperatura ambiente. O tecido foi submerso por 40 minutos em solução final de 100 microlitros (μL), contendo 30 μL de H (Número de catálogo H1399, Thermo Fisher Scientific, Nova York, EUA), 5 μL de EH-1, e 5 μL de CAM (Número de catálogo L3224, Live/Dead viability/cytotoxicity kit, Thermo Fisher Scientific, Nova York, EUA) e 60 μL de SSB. A lavagem foi repetida da mesma maneira para a retirada do excesso dos corantes. Uma placa “*CellView*” revestido por viscoelástico recebeu a face endotelial do enxerto posicionada para baixo e uma lamínula realizou leve pressão sobre a face da CPD, cobrindo a amostra.

Foram selecionados três canais no microscópio confocal para análise da fluorescência de cada reagente. Sob lente objetiva de cinco vezes a seco foi detectado a fluorescência em verde do citoplasma de células vivas coradas por CAM, nove imagens justapostas em modo “*TileScan*” foram processadas no programa “*LAS*” (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para a obtenção de uma imagem global do enxerto. Com

lente objetiva de vinte vezes e imersão em óleo foram obtidas imagens centrais do enxerto para contagem de núcleos com fluorescência azul de H e contagem de núcleos com fluorescência vermelha de EH-1, representando núcleos celulares com membrana íntegra e danificada respectivamente.

4.4 PROCESSAMENTO DAS IMAGENS

Foram selecionados os quatro melhores quadros das imagens da gravação do procedimento de preparo dos enxertos: bolha completamente formada, lamela livre em SSB antes, e após coloração por AT, e lamela aberta sobre um papel filtro. No mesmo plano do tecido foi apresentada medida padrão de três mm em um compasso, no programa "FIJI-ImageJ" a escala foi ajustada para milímetros. A média de três medidas digitais de cada variável foi calculada e transcrita para base de dados.

A contagem de núcleos viáveis corados por H e núcleos inviáveis corados por EH-1 foi realizada pelo processamento das imagens convertidas para 8-"bits", seguida dos comandos "*threshold*", "*process*" e "*analyse particles*", e o resultado da contagem em relação à área do enxerto estudada apresentou respectivamente as variáveis de DCE viáveis e inviáveis. Para determinar a PAV corada em verde por CAM em relação à área total do enxerto, no programa "FIJI-ImageJ" a escala foi zerada para que o número de "*pixels*" calculados na imagem global do enxerto fosse correspondente à área total; e seguindo os comandos "*Image*", "*Adjust*", e "*Color Threshold*" a seleção correspondente à área fluorescente teve a quantidade de "*pixels*" determinada. A relação entre a área de seleção e a área total foi expressa em porcentagem.

4.5 VARIÁVEIS COLETADAS

Dos prontuários médicos dos doadores no banco de olhos foram coletados dados de idade, sexo, diabetes mellitus, tempo entre o óbito e a preservação (TOP), e o tempo total de preservação (TTP). A gravação do procedimento de dissecções das córneas teve as imagens analisadas e o tempo de procedimento (TP) calculado em computador "*notebook*" da marca Acer. Foram obtidas medidas digitais no programa "FIJI-ImageJ" de quadros selecionados do arquivo de vídeo e os valores foram transcritos para uma tabela do programa "SPSS Statistics Base" versão 20.0 (IBM, Chicago, EUA). As seguintes variáveis foram coletadas: distância branco a branco posterior (DBBP), diâmetro da grande bolha (DGB), volume de ar injetado (VAI), comprimento do enxerto (CDE), largura central do enxerto (LCE), LCE após coloração por AT (AT-LCE), área do enxerto (AE) aberto, circularidade da margem do enxerto (CME), e ER.

4.6 QUESTIONÁRIOS

Dois vídeos demonstrativos da técnica de preparo de enxertos para CEPD foram editados com imagens do MB em duas dimensões e do CCE-3D em três dimensões. Oftalmologistas observadores assistiram aos dois vídeos e responderam um questionário aplicado previamente para comparação entre os dois tipos de microscópio⁸². Foram questionados sobre a percepção de quatro quesitos das imagens do vídeo: visibilidade das estruturas, qualidade de imagem, profundidade de foco, e capacidade didática. Uma escala de pontuação entre um e cinco foi utilizada para resposta, sendo: 1= muito baixa; 2= baixa; 3= média; 4= boa; 5= excelente (Questionário 1).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis do tipo contínuas foram submetidas à estatística descritiva e quantitativa, e os dados de contagem foram realizados por frequências totais e percentuais¹⁰¹. Para verificar a homogeneidade das variâncias dos resíduos das variáveis de DBBP, DGB, CDE, AE, e CME foram utilizados o teste de Levene¹⁰², e para verificar a normalidade dos resíduos foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk¹⁰³.

Foram realizadas análises de regressão linear e correlação de Pearson entre as variáveis: idade, DBBP, DGB, LCE, AT-LCE, AE e CME para os grupos CEPD e CEMD. Dados pareados foram analisados pelo teste “*t Student’s*”. Para verificar fatores relacionados à falha na dissecação foi construído um modelo criando uma variável binária, tendo como variáveis respostas consideradas idade, sexo, DCE em microscopia especular, TOP, TTP e diagnóstico de diabetes mellitus em um modelo de regressão logística. Para verificar a associação entre variáveis binárias ou de até três categorias foi utilizado o teste do qui-quadrado. Para verificar a distorção dos valores iniciais e finais da LCE entre os grupos CEPD e CEMD foi calculado o coeficiente de determinação (R^2), a correlação de Pearson e a equação linear entre as variáveis LCE e AT-LCE. Foram calculadas, da mesma maneira, a relação entre as variáveis DGB e DBBP, DGB e CDE, e idade do doador e LCE.

As médias da pontuação respondida no questionário comparativo das imagens do MB e CCE-3D e o intervalo interquartil (IIQ) foram calculados. O valor de “P” considerado como estatisticamente significativos foi menor que (<) 0,05; em função da limitada disponibilidade de tecidos e a curva de aprendizado usando CCE-3D não foram realizados testes comparativos com MB.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 RESULTADOS

Foram disponibilizados pelo banco de olhos 49 botões corneoesclerais de 28 doadores, dois tecidos de um mesmo doador foram excluídos por cirurgia ocular prévia. Dos 47 botões corneoesclerais incluídos no estudo foram obtidos por pneumodissecação 24 enxertos para CEPD, 17 para CEMD, e seis falhas. No artigo um foram incluídos os 24 enxertos para CEPD que por conveniência utilizaram no preparo MB em 16 e CCE-3D em oito dissecações. No artigo dois foram incluídos todos os tecidos: 24 enxertos para CEPD, 17 enxertos para CEMD, e seis com falha na dissecação.

5.2 ARTICLE 1

THREE-DIMENSIONAL HEADS-UP SURGERY FOR PRE-DESCEMET'S ENDOTHELIAL KERATOPLASTY GRAFT DISSECTION

PRADO, Rodrigo Bueno¹ (<https://orcid.org/0000-0002-8883-299X>)

OGUIDO, Ana Paula Miyagusko¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0634-1714>)

BORGHI, Sergio Marques² (<https://orcid.org/0000-0002-6978-7505>)

VERRI, Waldiceu Aparecido Junior² (<https://orcid.org/0000-0003-2756-9283>)

CASELLA, Antônio Marcelo Barbante^{1*} (<https://orcid.org/0000-0002-4552-2799>)

1-Surgical Clinic Department, Universidade Estadual de Londrina

2- Pathological Science Department, Universidade Estadual de Londrina

*corresponding author: mbcasella@gmail.com

Health Sciences Center – Universidade Estadual de Londrina

60 Robert Koch Av – 86038, Londrina, Paraná state, Brasil

DECLARATIONS:

Funding - own resources were used.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Study data is maintained by the investigators and is available upon request

Ethical approval – Research Ethics Committee 2,799,149 (Aug, 2018)

All authors consent to participate and publish

Key messages

What is known:

1- Pre-Descemet endothelial keratoplasty grafts are gaining importance due to the possibility of being obtained from all ages donors.

What's new:

2- Global graft assessment reveals endothelial cell loss pattern of PDEK tissue preparation.

3- Demonstrative video of PDEK grafts dissection with three-dimensional heads-up surgery (3D-HUS) contribute to teaching surgical technique for beginners

THREE-DIMENSIONAL HEADS-UP SURGERY IN PRE-DESCEMET'S ENDOTHELIAL KERATOPLASTY GRAFT DISSECTION

ABSTRACT

Purpose: To investigate the viability of PDEK grafts prepared with three-dimensional (3D) heads-up surgery (3D-HUS) and compare observers' satisfaction with two- and three-dimensional images.

Methods: The experimental study included 24 corneoscleral buttons successfully dissected for PDEK by intrastromal air injection, eight with 3D-HUS and 16 with BM sort by convenience. Type-1 big-bubbles were peripherally incised with a scalpel, and the posterior lamella was dissected using scissors and "S" stamped. Immunofluorescence analyses were performed using a confocal microscope, images were analyzed with ImageJ, and three variables were calculated: viable and unviable ECD and viable area percentage (VAP). Two videos were edited with graft dissection images from 3D-HUS and BM, and both were presented to ophthalmologists who answered a comparative questionnaire. Samples were analyzed by Student's t-test, and questionnaire answers were compared using the Mann-Whitney U test, and a P value <0.05, which was considered statistically significant. **Results:** The mean donor age was 54.8 ± 15.4 years, and 11 were male (64.7%). 3D-HUS dissection had procedure time (PT) of 12.02 ± 6.33 minutes and BM had PT of 13.55 ± 5.05 minutes ($P > 0.05$). Under PDEK and 3DHUS conditions, viable and unviable ECDs were 2407 cells/mm² and 37 cells/mm², respectively. VAP was 80.1%. Questionnaire scores were higher in 3D-HUS than in BM for all items ($P < 0.05$). **Conclusion:** The viability of PDEK grafts prepared using 3D-HUS was reported for the first time. Demonstrative 3D videos had higher scores for all items.

Keywords: Endothelial keratoplasty. Endothelial damage. Eye bank. Three-dimensional imaging.

INTRODUCTION

Pre-Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK) represents a posterior lamellar transplantation technique [1] that allows obtaining endothelial grafts from all age donors, including young donors with high endothelial cell density (ECD) [2]. PDEK and Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK) show similarities in terms of quick visual acuity recovery, reduced healing time, small incisions [3,4] and low rejection rates [5,6]. As a benefit, pre-Descemet's layer [7] addition to Descemet's membrane and endothelium cell layer decreases graft scrolling tendency, which facilitates intraocular opening [8]. However, PDEK graft preparation is different from DMEK; the pneumodissection technique to create a type-1 big-bubble (BB) followed by manual dissection has a long learning curve.

The distribution of precut grafts by eye banks represents an important aid in reducing the endothelial keratoplasty complexity [9], and it was demonstrated that DMEK tissue produced by ophthalmologists or technicians had similar endothelial cell damage [10]. Three-dimensional (3D) heads-up surgery (3D-HUS) digital visualization system has been applied in several ophthalmic surgeries for the anterior [11-12] and posterior segment [13-14], and it has been reported that gain in focus depth with reduced illumination compared to binocular microscope (BM) [15]. 3D images develop surgical skills training, decreasing the learning curve for beginners in other specialties [16,17]; however, there are no reports of this technological tool in the preparation of grafts for eye banks.

PURPOSE

To investigate the viability of PDEK grafts prepared with 3D-HUS and compare observers' satisfaction with demonstrative videos from 3D-HUS and BM images.

MATERIAL E METHODS

Experimental study of successfully PDEK grafts dissected with a 3D-HUS visualization system and BM by a single surgeon (Oguido APM) from September 2018 to August 2020. The inclusion criteria were as follows: disposal of corneal tissues with specular

microscopy count above 2.000 cells/mm² (Konam-Nishinomiya, Japan), which obtained type-1 or type-3 BB by intrastromal air injection. The requirement for informed consent was waived because it was signed during the organ donation process with legal guardians. Donors with a previous history of glaucoma, intraocular surgery, or uveitis were excluded from the analysis due to potential endothelial cell damage due to these pathologies. Data collected included age, sex, diabetes mellitus, specular microscopy count, death–preservation time (DPT), total preservation time (TPT), procedure time (PT), and air injected volume (AIV).

Convenience samples of corneosclerotic discs were dissected using a Leica microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) connected to a Ngenuity 3D system (Alcon, Fort Worth, USA) or BM Zeiss (OPMI VISU 160, Oberkochen, Germany). Two and 3D recorded images were edited in two similar videos titled: “Preparation of precut graft for pre-Descemet’s endothelial keratoplasty” which were presented to observers’ ophthalmologists who answered a comparative questionnaire, as previously described [18]. They were asked to rate a 1 to 5 scale: 1 = very low; 2 = low; 3 = average 4 = good; and 5 = excellent; the parameters were structure visibility, image quality, depth perception, and teaching capacity (**Questionnaire 1**).

Graft Preparation: The corneoscleral button was positioned with the endothelial side up on a trepanation block for staining with 0.1% trypan blue (Ophthalmos, Sao Paulo, Brazil) for 30 seconds. A 5 cm³ syringe filled with air coupled to a 30-gauge needle was introduced into the Schwalbe line, with the bevel facing upward, until it reached the central and posterior corneal stroma. Intrastromal air injection was performed until a type-1 BB was completely formed. A 15-degree scalpel incision was made in the bubble periphery, followed by partial dissection with scissors. An anterior three millimeters punch and “S” stamps were performed. Dissection was completed with scissors and the graft was submerged in balanced salt solution (BSS). The tissues were opened using a blunt spatula, and 4% paraformaldehyde was placed on a filter paper in a Petri dish.

Confocal microscope analysis: Representative PDEK grafts dissected with 3D-HUS were analyzed using a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) attached to LAS software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using an immunofluorescent assay for mammalian cells [19]. Triple staining was performed using 100 μ L solution containing 60 μ L BSS, 30 μ L Hoechst 33342 (H) (Catalog number H1399, Thermo Fisher Scientific, New York, USA) diluted in the proportion of 1:5000, 5 μ L Etdium-homodimer (EH-1), and 5 μ L of Calcein AM (CAM) (Catalog number L3224, Live/Dead viability/cytotoxicity kit, Thermo Fisher Scientific, New York, USA). At room temperature, the tissue was incubated for 45 min, followed by washing with a BSS drip. By manipulating only the filter paper, the graft was positioned with the endothelial face on a viscoelastic coating applied to the Petri dish, and the tissue was flattened by low pressure from a cover slip. The central graft area was analyzed with a 20x magnification objective lens, and a global graft image was produced with a 5x magnification objective lens and merged with nine juxtaposed images. Fluorescence emitted by three laser channels was analyzed: H in blue – viable nuclei, EH-1 in red – damaged nuclear membranes, and CAM in green – viable cytoplasm cells.

Statistical analysis: Data were transcribed and analyzed using the IBM-SPSS statistics base software version 20.0. Continuous variables are expressed as means and standard deviations, and categorical variables are counted individually. The Student's t-test was used for paired sample analysis. Images obtained with confocal fluorescence microscopy were analyzed using FIJI-ImageJ software, and three variables were obtained: viable ECD, number of blue fluorescence in relation to area, unviable ECD, number of red fluorescence in relation to area, viable area percentage (VAP), and green fluorescence area in relation to total graft area. The Mann-Whitney U test was used to compare observers' questionnaire answers, and a P value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Twenty-four corneas from 17 donors were dissected with mean donor age of 50.83 ± 16.26 years, 11 were male (64.7%), and three had diabetes mellitus (12.5%). Mean value of specular microscopy was 2382 ± 253 , DPT was 13.2 ± 6.9 hours and TPT was 31.2 ± 18.4 days (**TABLE 1**). Eight corneas were dissected with 3D-HUS (**Figure 1**), PT was 12.0 ± 6.3 minutes and AVI of $3.5 \pm 0.7 \text{ cm}^3$. Sixteen corneas were dissected using BM, PT was 13.5 ± 5.0 minutes and AIV of $3.5 \pm 0.8 \text{ cm}^3$ ($P > 0.05$). Under PDEK conditions with 3D-HUS immunofluorescence analysis, viable ECD was 2407 cells/mm^2 , and unviable ECD was 37 cells/mm^2 (**Figure 2**). The viability/cytotoxicity analysis and percentage of stained cells were calculated (**Figure 3**), and the colocalization rate of H cells stained by CAM or EH-1 was determined (**Figure 4**). VAP was 80.1% (**Figure 5**).

Nine observers' ophthalmologists with a mean age of 44.7 years and average professional experience of 19 years answered both questionnaires. Mean answers score were for 3D-HUS and BM respectively: 4.7 and 3.6 for structures visibility; 4.3 and 3.7 for image quality; 4.7 and 3.2 for depth of focus; 4.7 and 4 for teaching capacity ($P < 0.05$). All items answers were 18.6 for 3D-HUS and 14.7 for BM (**TABLE 2**).

DISCUSSION

The PDEK graft dissection using 3D-HUS system and PDEK global graft viability were described for the first time. Most of the non-fluorescent areas corresponded to graft folds with the concentration of dead cells; hypotonia after ocular enucleation as well as BB formation explain this endothelial cell loss pattern. Viable ECD of 2407 cells/mm^2 in central area of the PDEK graft highlights the potential applicability of the method in the processing and distribution of pre-cut tissue by eye banks. Pre-cut endothelial grafts reduce endothelial keratoplasty complexity, and the eye bank plays an important role in the quality and safety of recipients. Corneas referred for disposal were included in this study, with mean specular microscopy of 2376 cells/mm^2 and TPT of 35 days, representing two and a half times the

acceptable period of 14 days. By logical deduction, similar or superior results to those presented in this study should occur in suitable corneas for transplantation.

Type-1 BBD is limited due to strong adhesion of PDL in cornea periphery, in order to obtain the largest size for PDEK grafts manual scissor dissection is preferred over trephination. The merge of nine images mounted a global graft viability image that demonstrated non-fluorescent areas concentrated in graft periphery and folds areas. Viability and cytotoxicity assay demonstrated higher prevalence of viable cells stained by CAM, and few unviable cells stained by EH-1 concentrated in graft folds. Colocalization rate of viable nuclei stained by H and CAM was superior to 70% in central graft area.

PDEK graft dissection presents a focus depth change; the posterior lamella is convex with BB formed and concave with BB emptied. The depth of focus was the questionnaire item with the greatest difference between the two dimension and 3D video images. In addition, lower lighting with better image quality in 3D-HUS allows better results for structure visibility, and the camera in 3D-HUS works in an image mode with a greater dynamic range than traditional cameras allowing the human eyes to see digital images as superior to BM images [14]. Endothelial graft dissection using the 3D-HUS system enabled the presentation of the surgical technique with better identification of structures, image quality, depth perception, and didactic capacity.

3D-HUS dissection had higher PT than BM without statistical significance; the 90 millisecond delay between the surgeon's hand movement and the screen image using 3D-HUS [13] did not influence the dissection results. Although the didactic ability received a higher score for 3D-HUS, this study is limited by its small population and requires a larger study to further characterize the benefits of 3D systems for novice trainees over a longer duration.

CONCLUSION

The global viability of PDEK grafts using 3D-HUS was investigated for the first time; the technique produced viable ECD with values considered suitable for transplantation by the

eye bank. 3D demonstrative video presented a better perception of endothelial graft dissection in terms of structure visibility, quality image, depth perception, and teaching capacity.

QUESTIONNAIRE-1

YOU WILL WATCH TWO VIDEOS TITLED: "GRAFT PREPARATION FOR PRE-DESCEMET ENDOTHELIAL KERATOPLASTY", THE FIRST WITH IMAGES FROM BINOCULAR MICROSCOPE AND THE SECOND FROM THREE-DIMENSIONS HEADS-UP SURGERY

BINOCULAR MICROSCOPE SYSTEM

FOLLOWING THE 1 TO 5 SCALE

1 = VERY LOW; 2 = LOW; 3 = AVERAGE; 4 = GOOD; 5 = EXCELLENT

POINTS YOUR PERCEPTION OF THE QUESTIONS:

STRUCTURES VISIBILITY	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
IMAGE QUALITY	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
DEPTH PERCEPTION	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
TEACHING CAPACITY	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)

THREE DIMENSIONS HEADS-UP SURGERY SYSTEM

FOLLOWING THE 1 TO 5 SCALE

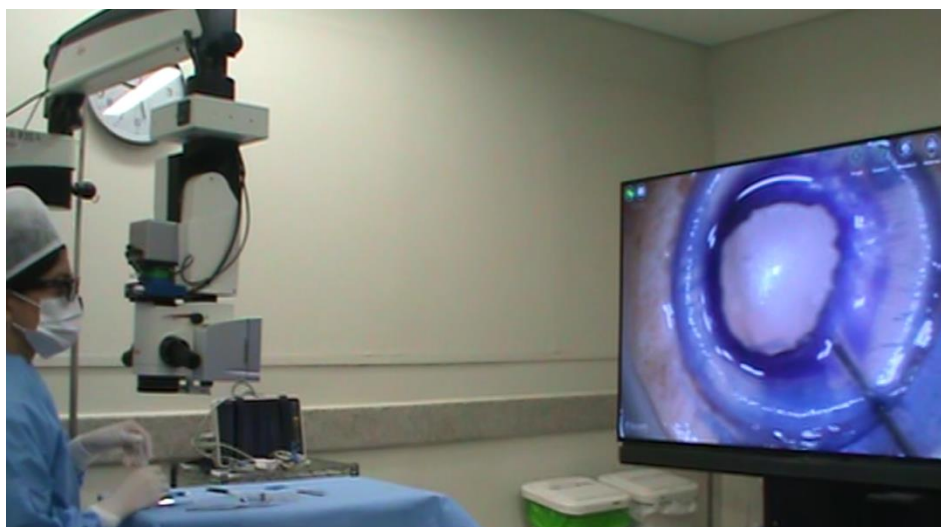
1 = VERY LOW; 2 = LOW; 3 = AVERAGE; 4 = GOOD; 5 = EXCELLENT

POINTS YOUR PERCEPTION OF THE QUESTIONS:

STRUCTURES VISIBILITY	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
IMAGE QUALITY	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
DEPTH PERCEPTION	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
TEACHING CAPACITY	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)

TABLE 1 - Demographic parameters of donors and corneas included in data analysis

Donors parameters	n	Mean \pm standard deviation or percentage
Age	17	54.8 \pm 15.4 years
Sex	17	11 Male (64.7%) / 6 Female (35,3%)
Diabetes mellitus	3	12.5%
Corneas parameters	n	Mean \pm standard deviation
Endothelial cell density	24	2382 \pm 253 cells/mm ²
Death-preservation time	24	13.2 \pm 6.9 hours
Total preservation time	24	31.2 \pm 18.4 days

**FIGURE 1** – Photograph of pre-Descemet endothelial keratoplasty graft dissection using three dimension heads-up surgery system.

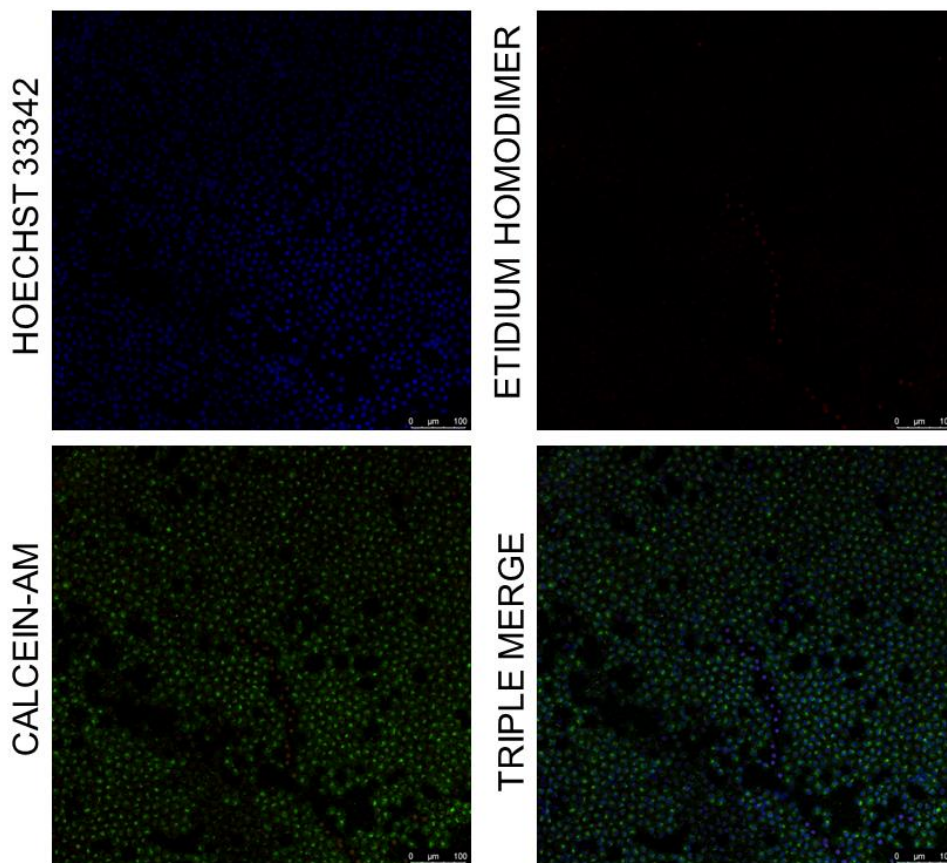


FIGURE 2 - Pre-Descemet endothelial keratoplasty graft with 20x objective lens of central area and confocal microscope fluorescence analysis with triple staining. Viable endothelial cell density of 2407 cells/mm² stained with Hoechst 33342; unviable endothelial cell density of 37 cells/mm² stained with Ethidium-homodimer; green fluorescence of live cell cytoplasm stained with Calcein AM; three laser channels overlapping images.

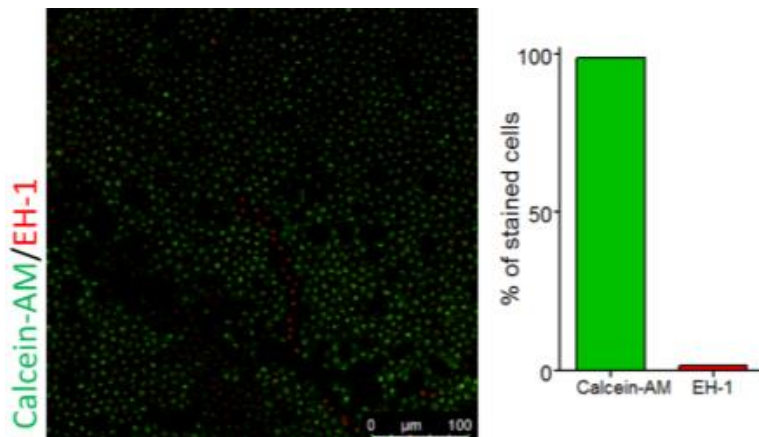


FIGURE 3 - Viability and cytotoxicity assay of Pre-Descemet endothelial keratoplasty graft and confocal microscope fluorescence. FIJI-ImageJ processed images with percentage bar graphic of stained cells in green by Calcein-AM and red by ethidium-homodimer (EH-1).

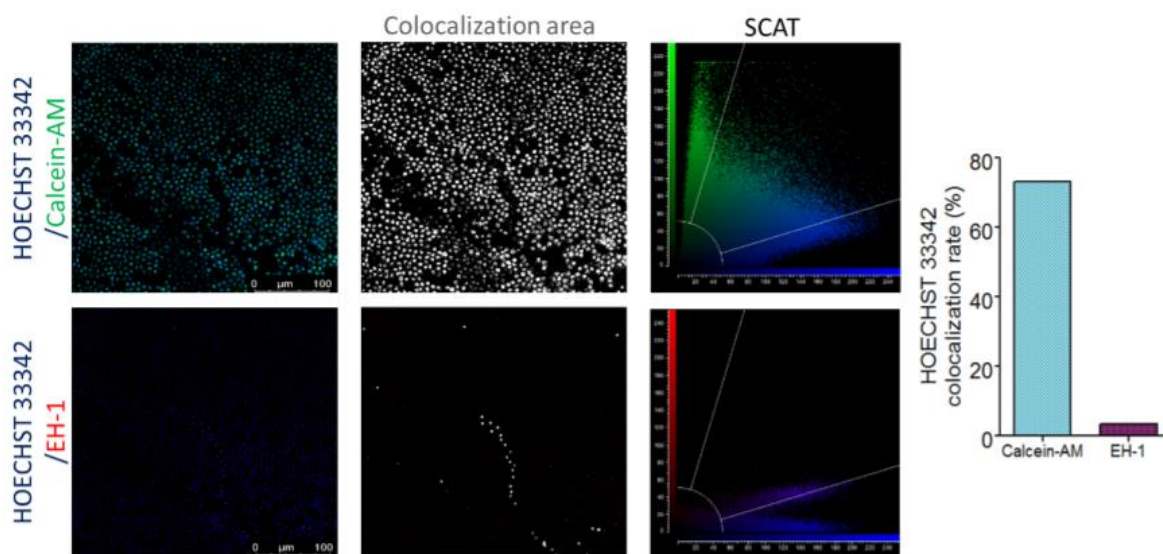


FIGURE 4 – Pre-Descemet endothelial keratoplasty graft and confocal microscope fluorescence analysis. FIJI-ImageJ processed images with percentage bar graphic of Hoechst 33342 stained cells and colocalization rate with Calcein-AM or Ethidium-homodimer (EH-1).

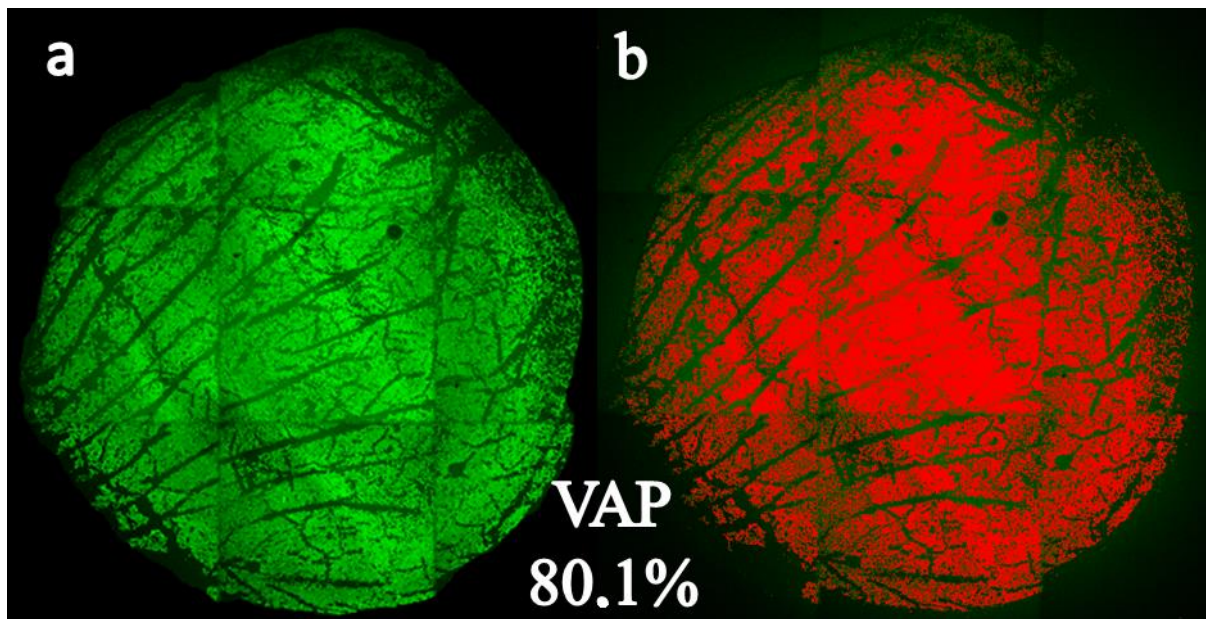


FIGURE 5 – Global graft viability assessment for pre-Descemet endothelial keratoplasty sample digitally mounted with nine juxtaposed images. Green fluorescence represents viable cells cytoplasm and dark areas are indicative of cellular dropout. Viable area percentage (VAP) was calculated with FIJI-ImageJ software by the relation of: a) graft area determined in original image in pixels; b) color threshold area selection of corresponding to green fluorescence.

TABLE 2 - Mean scores of observers' questionnaire and interquartile range (IQR) for PDEK technique video using 3D heads-up surgery (3D-HUS) and binocular microscope (BM).

MICROSCOPE TYPE IMAGES	3D-HUS	BM	P value
MEAN SATISFACTION [IQR]	18.64 [18-20]	14.76 [12-17]	<0.05
STRUCTURES VISIBILITY	4.77 [5-5]	3.77 [3-4]	<0.05
IMAGE QUALITY	4.33 [4-5]	3.77 [3-4,5]	<0.05
DEPTH PERCEPTION	4.77 [4,5-5]	3.22 [2,5-4]	<0.05
TEACHING CAPACITY	4.77 [4,5-5]	4 [3,5-4,5]	<0.05

REFERENCES

- [1] Agarwal A, Dua HS, Narang P, Kumar DA, Agarwal A, Jacob S, et al. (2014) Pre-Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK). *Br J Ophthalmol* 98:1181-1185.
- [2] Agarwal A, Agarwal A, Kumar DA, Jacob S (2015) Pre-Descemet endothelial keratoplasty with infant donor cornea: a prospective analysis. *Cornea* 34:859-865.
- [3] Price, MO. Price FW Jr (2008) Endothelial cell loss after Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: Influencing factors and 2-year trend. *Ophthalmology* 115(5):857-865. doi: 10.1016/j.optha.2007.06.033.
- [4] Price MO, Price FW (2006) Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue. *Ophthalmology* 113(11):1936-42.
- [5] Anshu A, Price MO, Price FW (2012) Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology* 119:536-540.
- [6] Pereira, NC, et al. (2013) Complicações em transplantes endoteliais realizados por estagiários de córnea. *Arq Bras Oftalmol* 76(5):301-4.
- [7] Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J (2013) Human corneal anatomy redefined: A novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* 120:1778-85.
- [8] Mohammed I, Ross AR, Britton JO, Said DG, Dua HS (2018) Elastin content and distribution in endothelial keratoplasty tissue determines direction of scrolling. *Am J Ophthalmol* 194:16-25.

[9] Newman LR, DeMill DL, Zeidenweber DA, Mayko ZM, Bauer AJ, Tran KD, Straiko MD, Terry MA (2018) Preloaded Descemet's membrane endothelial keratoplasty donor tissue: Surgical technique and early clinical results. *Cornea* 37(8):981-986.

[10] Regnier M, Auxenfans C, Maucort-Boulch D, Marty AS, Damour O, Burillon, Kocaba V (2017) Eye bank prepared versus surgeon cut endothelial graft tissue for Descemet's membrane endothelial keratoplasty: An observational study. *Medicine (Baltimore)* 96(19):e6885.

[11] Mohamed YH, Uematsu M, Inoue D, Kitaoka T (2017) First experience of nDSAEK with heads-up surgery: A case report. *Medicine (Baltimore)* 96(19):e6906. Erratum in: *Medicine (Baltimore)* 2018;97(35):e12287.

[12] Galvis V, Berrospi RD, Arias JD, Tello A, Bernal JC (2017) Heads up Descemet membrane endothelial keratoplasty performed using a 3D visualization system. *J Surg Case Rep* 2017(11):rjx231.

[13] Eckardt C, Paulo EB (2016) Heads-up surgery for vitreoretinal procedures: an experimental and clinical study. *Retina* 36:137-47.

[14] Kunikata H, Abe T, Nakazawa T (2016) Heads-up macular surgery with a 27-gauge microincision vitrectomy system and minimal illumination. *Case Rep Ophthalmol* 7:265-9.

[15] Adam MK, Thornton S, Regillo CD, Park C, Ho AC, Hsu J (2017) Minimal endoillumination levels and display luminous emittance during three-dimensional heads-up

vitreoretinal surgery. *Retina* 37(9):1746–9. doi: 10.1097/IAE.0000000000001420. PMID: 27902640.

[16] Han KN, Kim HK, Choi YH (2018) Application of a three-dimensional video system in the training for uniportal thoracoscopic surgery. *J Thorac Dis* 10(6):3643-3650.

[17] Liu J, Li J, Wei W, et al. (2019) Potential of the glasses-free three-dimensional display system in shortening the learning curve of video-assisted endoscopic surgery: a self-controlled *ex-vivo* study. *Ann Transl Med* 7(20):521.

[18] Romano MR, Cennamo G, Comune C, Cennamo M, Ferrara M, Rombetto L, Cennamo G (2018) Evaluation of 3D heads-up vitrectomy: outcomes of psychometric skills testing and surgeon satisfaction. *Eye* 32(6):1093-1098.

[19] Pipparelli A, Thuret G, Toubeau G, He Z, Piselli S, Lefe`vre S, Gain P, Muraine M (2011) Pan-corneal endothelial viability assessment: Application to endothelial grafts predissected by eye banks. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(8):6018-6025. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6641>.

[20] Bloch E, Uddin N, Gannon L, Rantell K, Jain S (2015) The effects of absence of stereopsis on performance of a simulated surgical task in two-dimensional and three-dimensional viewing conditions. *Br J Ophthalmol* 99:240–5.

5.3 ARTICLE 2

DIGITAL MEASUREMENTS AND SCROLLING CHARACTERISTICS OF PRECUT ENDOTHELIAL KERATOPLASTY GRAFTS AFTER TRYPAN BLUE STAINING

PRADO, Rodrigo Bueno¹ (<https://orcid.org/0000-0002-8883-299X>)

OGUIDO, Ana Paula Miyagusko¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0634-1714>)

BORGHI, Sergio Marques² (<https://orcid.org/0000-0002-6978-7505>)

VERRI, Waldiceu Aparecido Junior² (<https://orcid.org/0000-0003-2756-9283>)

CASELLA, Antônio Marcelo Barbante^{1*} (<https://orcid.org/0000-0002-4552-2799>)

1- Surgical Clinic Department of Universidade Estadual de Londrina

2- Pathological Science Department of Universidade Estadual de Londrina

*corresponding author: mbcasella@gmail.com

Health Sciences Center – Universidade Estadual de Londrina
60 Robert Koch Av – 86038, Londrina, Paraná state, Brasil

Funding - own resources were used

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Data and material are available for consult

Ethical approval - Research Ethics Committee 2,799,149 (Aug, 2018)

All authors consent to participate and publish

ABSTRACT

Purpose: to determine the digital measurements and scrolling characteristics of endothelial grafts after trypan blue (TB) staining. **Methods:** the experimental study included 47 corneoscleral buttons dissected by intrastromal air injection into pre-Descemet endothelial keratoplasty (PDEK) and Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK). Scrolling score (SS) was determined and graft measurements were obtained using FIJI-ImageJ: central graft width (CGW) before and after TB staining (TB-CGW), posterior white-to-white distance (PWTWD), big bubble diameter (BBD), graft length (GL), graft area (GA), and graft margin circularity (GMC). Student's "t-test" was applied to paired samples. Pearson correlation coefficients were calculated for: age, BBD, PWTWD, GL, CGW, TB-CGW. Unpaired samples were analyzed using MannWhitney test. Failed dissection and risk factors were analyzed using the chi-square test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS: donors average age was 53.85 ± 14.5 years and 18 were male donors (66.6%). Twenty-four PDEK grafts (51%) and 17 DMEK grafts (36.2%) were dissected. Six dissections failed (12.8%), and half were from diabetic donors ($P < 0.001$). CGW did not change significantly after TB; PDEK grafts had significantly higher CGW than DMEK grafts ($P < 0.05$). Age and CGW were weakly correlated with DMEK. DMEK had higher BBD, GL, GA, and GMC than PDEK ($P < 0.05$). PDEK grafts were SS-2 (50%) and DMEK grafts were SS-3 (70.5%).

CONCLUSION: TB staining did not change the CGW measurements and SS characteristics of PDEK and DMEK grafts. There was an inverse relationship between the CGW and SS. Donor age and CGW were weakly correlated only with the DMEK grafts.

Keywords: Endothelial keratoplasty. Eye bank. Trypan blue. Fuchs endothelial dystrophy.

INTRODUCTION

Corneal endothelial insufficiency seen in Fuchs endothelial dystrophy and bullous keratopathy is treated by endothelial keratoplasty (EK) with increasing frequency^{1,2}. In this scenario, precut, prestained, and preloaded grafts processed by the eye bank guarantee the recipient's safety and reduce the lamellar transplant complexity^{3,4}. Grafts for “Descemet membrane endothelial keratoplasty” (DMEK) and “pre-Descemet endothelial keratoplasty” (PDEK)⁵ have been dissected by the eye bank and delivered to a surgeon loaded inside a modified Jones tube or a plastic cartridge^{6,7}. However, there are several differences between the morphometric characteristics of these two modalities^{9,10}. The addition of a pre-Descemet layer decreased the PDEK graft scrolling tendency compared to DMEK¹¹. Wide central graft width (CGW) could be beneficial for intraocular graft opening¹²; however, delivering vials for PDEK grafts should have a narrower diameter assessed to prevent contact and consequent decrease in endothelial cell density (ECD).

Trypan blue (TB) staining improves basement membrane visibility and manipulation¹³, and tissue processed by the eye bank for posterior lamellar transplantation are prestained. Increased stiffness in Descemet's membrane after TB staining with atomic force microscope¹⁴; however, there are no studies on the effects of dye on the dimensions and scrolling characteristics of PDEK and DMEK grafts.

PURPOSE

To determine digital measurements and scrolling characteristics of PDEK and DMEK grafts before and after TB staining.

METHODS

Study design: An experimental and comparative study to analyze precut graft preparation for EK by a single surgeon (Oguido APM) from September 2018 to August 2020. This study was approved by the research ethics committee, and the requirement for informed consent was waived because it was signed in the organ donation process. Forty-nine

corneoscleral buttons were provided by eye bank, inclusion criteria were ECD count above 2000 cells/mm² by specular microscopy (Konam, Nishinomiya, Japan). Patients with a history of glaucoma, intraocular surgery, or uveitis were excluded. Two groups were formed according to the BB type obtained: PDEK group, type-1 and type-3 BB; DMEK group, type-2 BB. The dissection failure status was quantified and related to risk factors.

Graft Preparation: The corneoscleral button was positioned with the endothelial side up on a trepanation block and stained with 0.1% trypan blue (Ophthalmos, São Paulo, Brazil) for 30 seconds. A 5 cm³ syringe filled with air coupled to a 30-gauge needle was introduced into the Schwalbe line with the bevel facing upwards until it reached the central and posterior corneal stroma. Intrastromal air injection was performed until BB was completely formed. PDEK grafts were dissected using a 15-degree scalpel and scissors, while DMEK grafts were cut with an 8.25 mm trephine (Katena, New Jersey, USA). A three millimeters anterior punch was performed and “S” was stamped. The endothelial graft roll submerged in BSS was analyzed before and after five minutes submerged in TB, and the graft was opened on a filter paper with a blunt spatula.

Variables collected: Data on age, sex, donors diabetes mellitus, death to preservation time (DPT), total preservation time (TPT), procedure time (PT), air injected volume (AIV) were obtained. The dissection video of each graft had four frames that were selected and analyzed. Digital measurements were obtained using the FIJI-ImageJ software, and values were transcribed using IBM-SPSS Statistics Base software version 20.0. A three millimeter (mm) caliper set the scale and average of three measurements for each variable was calculated.: posterior white-to-white distance (PWTWD), big bubble diameter (BBD), graft length (GL), CGW, CGW after TB staining (TB-CGW), graft area (GA), graft margins circularity (GMC). The SS classification was performed according to a previous description [13]: SS-1 - graft edges do not touch, SS-2 - graft edges touch, SS-3 - a graft roll is formed, and SS-4 - more than one roll or a thin and tight roll is formed.

Statistical analysis: Continuous variables were submitted to descriptive statistics, and counting data were analyzed using total and percentage frequencies. Levene's test

verified the residue homogeneity of variances, and the Shapiro-Wilk test was used to test the normality of residues. Student's t test and Pearson correlation were used to investigate the relationship between donor age, PWTWD, BBD, CGW, TB-CGW, GA, and CGM. Under PDEK conditions, dispersion values, coefficient of determination (R^2), and Pearson's linear correlation were applied to verify the relationship between PWTWD and BBD, and GL and BBD, CGW and PT-CGW, CGW, and donor age. Unpaired samples were analyzed using the Mann-Whitney test, and the chi-square association test was used to analyze the failure dissection status and risk factors. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Forty-seven corneas from 27 donors were included, 21 were bilateral and seven were unilateral, and two corneas from one donor were excluded because of previous eye surgery. The mean donor age was 53.8 ± 14.5 years (range, 18 – 70 years), and 18 donors were male (66.6%). Mean ECD was 2376 ± 244 , DPT was 14.4 ± 8.8 hours, and TPT was 36.5 ± 25.6 days. Six corneas (12.7%) from four donors had diabetes mellitus (**Table 1**).

Twenty-four corneas (51%) composed PDEK group that had type-1 BB (79.1%) and type-3 BB (20.8%) formation with AIV of 3.5 ± 3.0 cm³ (range: 0.5 - 12) and PT of 12.5 ± 5.7 minutes. 17 corneas (36.2%) had type-2 BB formation and composed DMEK group with AIV of 4.6 ± 4.1 cm³ (range: 0.3 - 15) and PT of 4.7 ± 4.1 minutes. Six corneas (12.7%) from six donors failed to dissect, and all contralateral corneas were successfully prepared. The AIV for failed bubbles was 4.5 ± 4.5 cm³ (range: 0.5 - 12.2).

There were significant differences in BBD, GL, GA, and GMC between the PDEK and DMEK groups (**Fig. 1**); only PWTWD had similar results (**Table 2**). There was a weak linear correlation between BBD and PWTWD (**Fig. 2**), BBD and GL (**Fig. 3**). TB staining did not alter the morphological characteristics of all EK grafts, and the frequencies of SS classification for both surgical modalities are shown in **Fig. 4**. PDEK grafts SS-2 were the most frequent (50%), followed by SS-3 (30%), and DMEK grafts SS-3 were the most frequent (70.5%), followed by SS-4 (17.6%). For PDEK grafts, the mean CGW was $2.344 \pm$

0.398 and TB-CGW was 2.393 ± 0.363 ($P=0.293$), with an inverse relationship between CGW and SS (**Table 3**). The mean CGW for DMEK grafts was 1.868 ± 0.399 mm, and the mean TB-CGW was 1.851 ± 0.378 mm (**Table 4**). The difference between CGW and TB-CGW for both DMEK and PDEK grafts was not statistically significant ($P>0.05$), and age showed an inverse relationship with SS classification. There is no correlation between age and CGW in PDEK group ($R^2=0.0004$) and a weak correlation in DMEK group ($R^2=0.28$) with linear positive relationship in "t-test" (**Fig. 5**). The CGW and TB-CGW correlations for the PDEK group were strong ($R^2=0.87$), while the correlation was lower for the DMEK group ($R^2=0.73$), demonstrating greater distortion between the initial and final CGW values for the DMEK group (**Fig. 6**). The mean CGW of grafts that obtained type-3 BB was higher than that of type-1 BB in the PDEK group; however, the difference was not statistically significant ($P>0.05$).

The incidence of diabetes in the failure group was three out of six individuals (50%), while dissection success was three of 41 individuals (7.3%) (**Fig. 7**). The chi-square association test for failed dissection and diabetes mellitus was statistically significant ($P<0.001$).

DISCUSSION

For the first time, a standardized approach to graft measurement using FIJI-ImageJ software was performed; PDEK and DMEK grafts stained by TB did not undergo significant changes in measurements and scrolling characteristics after dye. Atomic force microscopy analysis demonstrated increased stiffness of DM fragments after TB staining¹⁴ and proposed a crosslinking process induced by light exposure. In this analysis, the stained grafts were exposed to direct and indirect illumination from the surgical microscope light source and operating room lights. However, the quantity of light treatment was not controlled, which could be a limitation of this study.

A BSS-submerged endothelial graft assumes a roller configuration with the endothelial cell layer facing outward; it is known that this phenomenon occurs with less

intensity in PDEK tissues than in DMEK⁹, which was confirmed by 20% greater CGW measurements and SS-2 (50%), which describes loose grafts in a double-roll format and edges touch. The presence of PDL increases posterior lamella thickness and reduces the resultant forces exerted by the DM anterior band due to the high concentration of elastin¹¹. The constant secretion of endothelial cells during life increases the thickness of the DM posterior band, which reduces the scrolling tendency of the DMEK tissue from elderly donors¹⁵. The PDEK technique obtains endothelial grafts from all age donor corneas¹⁶ and the frequency of eye bank processing these grafts should increase in the coming years. This study presents CGW and SS as two measures easily obtainable during tissue processing, which enables surgeons to predict the degree of difficulty of intraocular opening, and larger vials should prevent endothelial touch during aspiration and injection process for PDEK grafts.

Young donors with high ECD are desirable for EK; however, the greater scrolling tendency of these grafts makes intraocular opening and adherence to the recipient bed a difficult process, and it was found that tight PDEK grafts from donors aged < 50 years. Although air dissection can produce DMEK grafts even in tissues from young donors, which would not be possible by stripping techniques due to strong DM adherence, CGW measurement was 1.1 mm and SS-4 classification describes an extremely tight graft that should not be distributed by the eye bank. Because the PDL is impermeable to air, an important tool for the safe production of PDEK grafts consists of a clamp to occlude peripheral fenestrations that allow type-2 BB formation¹⁷. In the present analysis, the clamp was not adopted to produce all BB types and compose comparative groups for DMEK and PDEK.

The strong peripheral adhesion of PDL to the corneal stroma limits the size of type-1 BB, and consequently PDEK grafts also have a limited maximum size. The aim of scissors cutting was to obtain the highest possible GL values, and graft margin circularity was quantified for the first time; trephination performed a programmed cut with higher GMC ($P < 0.001$), with a value of 1 for a perfect circle, and PDEK graft GMC was 0.815, which

represents circularity values that should not influence clinical results. PWTWD measurements represent the cornea size; theoretically, we can suggest that higher BBD and GL values are expected from corneas with higher PWTWD values, and a weak correlation was found for this proposition. It was suggested that trephination size could represent graft length¹⁵; thus, CGW for DMEK was previously calculated. If this premise were true an 8.25 mm trephination for DMEK grafts could produce GL with same values, however mean GL was 8.71 mm. GL and GA are related to trephination size for DMEK grafts, whereas in PDEK tissue, BBD and manual cutting are responsible for graft size. The cornea has a concave shape on its posterior face and a convex shape during BB formation; when the submerged graft rectifies the tissue with the largest diameter and wraps in the perpendicular direction; thus, the GL values are greater than those of the BBD.

There was a suggestion for exclusion of the contralateral cornea after dissection failure by DM stripping of the first cornea¹⁸; with air dissection, no data were found to support this statement. All corneas with failed bubble formation underwent successful contralateral dissection. Dissection failure occurred in donors with diabetes mellitus in three out of six (50%) corneas, and the correlation of this comorbidity and the strong adherence of DM in stripping techniques is well known¹⁹⁻²¹; however, air dissection between the stroma and pre-Descemet layer could be less influenced by the effects of chronic hyperglycemia.

CONCLUSION

Digital measurements and scrolling characteristics of pre-cut endothelial grafts are described. CGW did not change significantly after TB in either modality; PDEK grafts had significantly higher CGW than DMEK ($P < 0.05$), and there was an inverse relationship between CGW and SS. Donor age and CGW had a weak correlation with DMEK and no correlation with PDEK grafts.

TABLE 1 - Demographics data of cornea donor tissue from eye bank records.

Donor parameters	n	Mean \pm standard deviation or percentage
Age	27	53.85 \pm 14.51 years
Male	18	66.6%
Female	9	33.4%
Corneas parameters	n	Mean \pm standard deviation or percentage
Endothelial cell density	47	2376 \pm 244 cells/mm ²
Death to preservation time	47	14.48 \pm 8.83 hours
Total preservation time	47	36.56 \pm 25.64 days
Diabetes Mellitus	6	12.7%

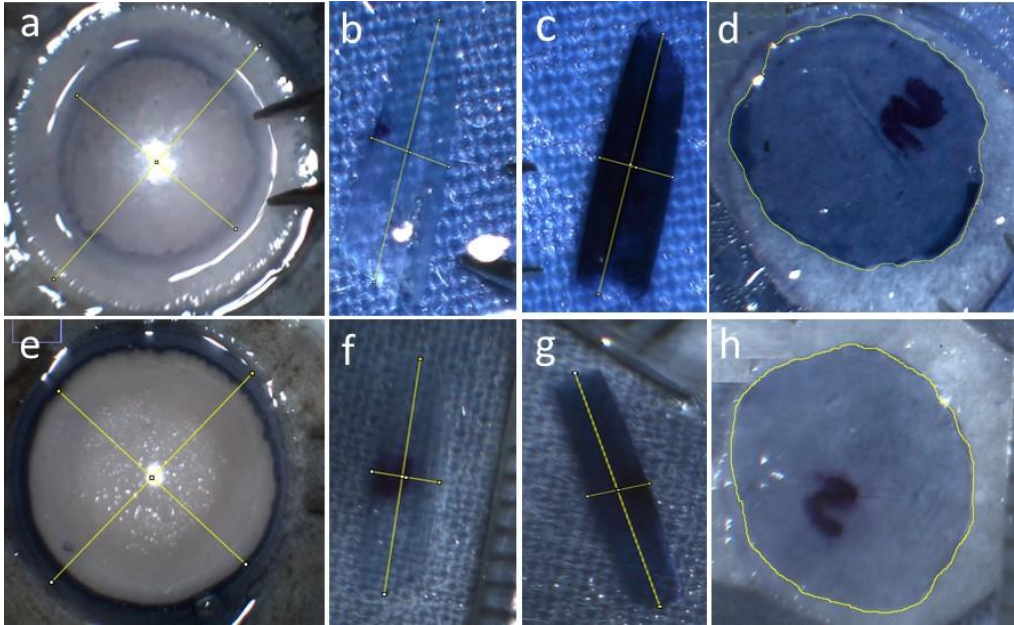


FIGURE 1 – Four selected frames from recorded dissection video of Pre-Descemet endothelial keratoplasty (upper boxes) and Descemet membrane endothelial keratoplasty (lower boxes) grafts. Digital measurements were obtained in FIJI-ImageJ software: white-to-white distance (PWTWD) (right diagonal; a,e); big bubble diameter (BBD) (left diagonal; a,e); graft length (GL) (vertical line; b,c,f,g); central graft width (CGW) (horizontal line; b,f); CGW after trypan blue staining (TB-CGW) (horizontal line; c,g); graft area (GA) (d,h); and graft margin circularity (GMC) (d,h).

TABLE 2 - PDEK and DMEK grafts mean values, standard deviation (SD) and P value of posterior white to white distance (PWTWD), big bubble diameter (BBD), graft length (GL), graft area (GA), and graft margin circularity (GMC).

	PDEK group Mean ± DP n=24	Range (min-max)	DMEK group Mean ± DP n=17	Range (min -max)	"P"
PWTWD	11.660 ± 0.387	(11.072 – 12.411)	11.750 ± 0.448	(11.070 – 12.565)	0.496
BBD	7.402 ± 0.443	(6.487 – 8.374)	10.400 ± 0.467	(9.110 – 10.815)	<0,001
GL	7.913 ± 0.415	(7.104 – 8.694)	8.717 ± 0.519	(7.719 – 9.726)	<0,001
GA	50.763 ± 7.121	(33.201 – 66.192)	60.999 ± 9.293	(47.860 – 78.186)	<0,001
GMC	0.815 ± 0.068	(0.694 – 0.911)	0.895 ± 0.0295	(0.821 – 0.922)	<0,001

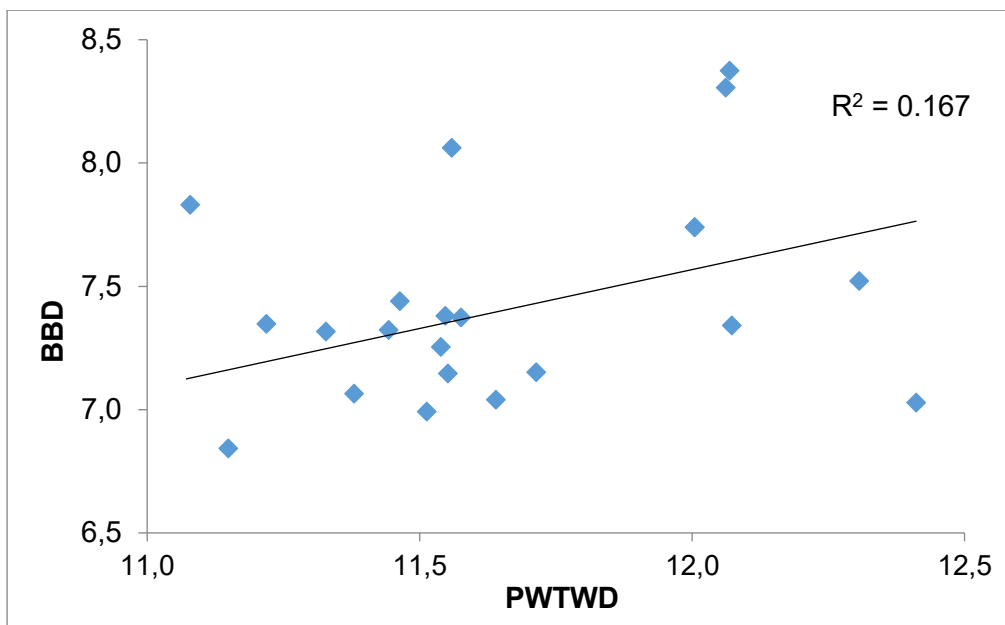


FIGURE 2 - Dispersion values, determination coefficient, and Pearson linear correlation of big bubble diameter (BBD) and posterior white-to-white distance (PWTWD) for PDEK grafts.

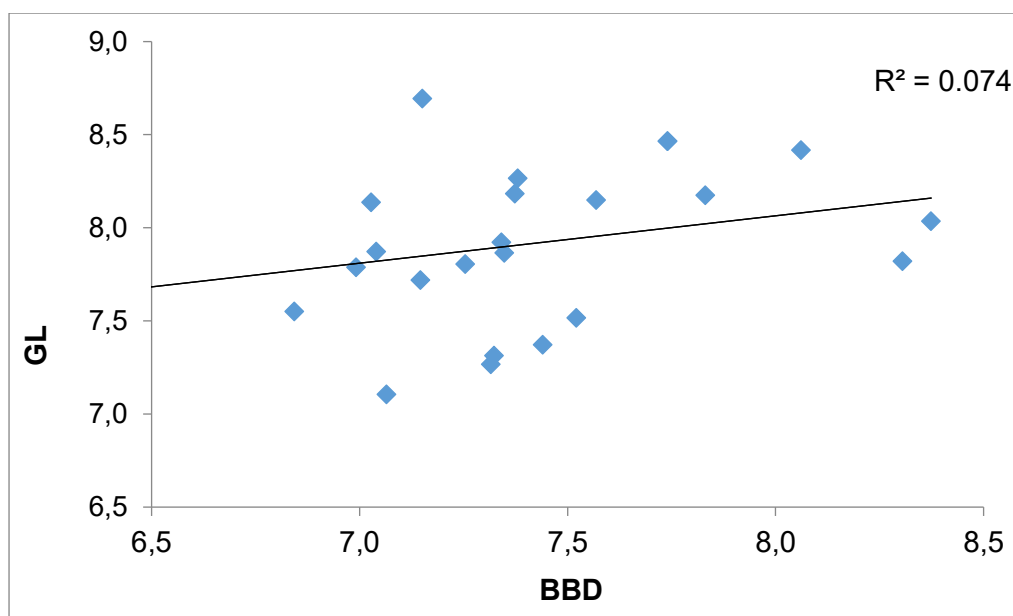


FIGURE 3 - Dispersion values, determination coefficient, and Pearson linear correlation of graft length (GL) and big bubble diameter (BBD) for PDEK grafts.

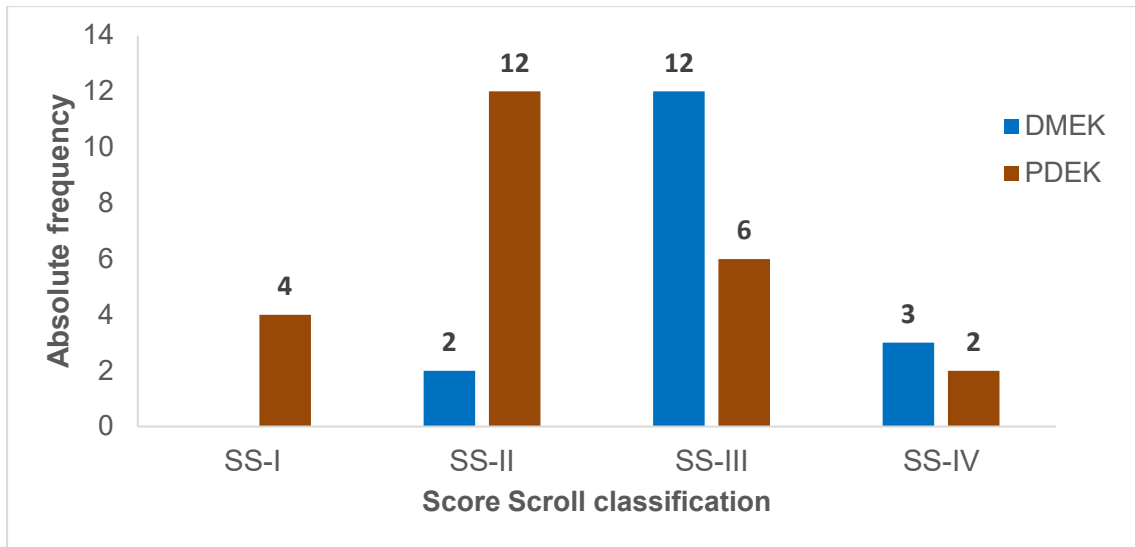


FIGURE 4 - Frequency of scroll score (SS) for PDEK and DMEK grafts.

TABLE 3 - Mean values, standard deviation (SD) and P value of central graft width (CGW) before and after trypan blue staining (TB-CGW) according to scroll score (SS) for PDEK grafts.

Scroll Score SS	CGW Mean \pm SD (range)	TB-CGW Mean \pm SD (range)	Age Mean \pm SD	P
SS-1 n=4	2.741 \pm 0.303 (2.47 - 3.16)	2.81 \pm 0.309 (2.53 - 3.23)	41.25 \pm 26.92	0.721
SS-2 n=12	2.419 \pm 0.264 (2.05 - 3.00)	2.412 \pm 0.271 (2.21 - 3.01)	52.08 \pm 13.97	0.946
SS-3 n=6	2.105 \pm 0.388 (1.67 - 2.72)	2.190 \pm 0.266 (1.78 - 2.53)	60.00 \pm 11.28	0.612
SS-4 n=2	1.999 \pm 0.509 (1.96 - 2.04)	2.114 \pm 0.218 (1.96 - 2.27)	35.00 \pm 00	0.612
All groups n=24	2.359 \pm 0.365 (1.67 - 3.16)	2.398 \pm 0.337 (1.78 - 3.23)	50.83 \pm 16.26	>0.05

TABLE 4 - Mean values, standard deviation (SD) and P value of central graft width (CGW) before and after trypan blue staining (TB-CGW) according to scroll score (SS) for DMEK grafts.

Scroll Score SS	CGW Mean \pm SD (range)	TB-CGW Mean \pm SD (range)	Age Mean \pm SD	P
SS-2 n=2	2.470 \pm 0.148 (2.37 - 2.58)	2.465 \pm 0.062 (2.42 - 2.51)	57.00 \pm 0.0	0.986
SS-3 n=12	1.983 \pm 0.349 (1.52 - 2.2)	1.977 \pm 0.251 (1.73 - 2.52)	60.92 \pm 4.79	0.961
SS-4 n=3	1.503 \pm 0.341 (1.14 - 1.81)	1.348 \pm 0.422 (1.02 - 1.83)	32.00 \pm 8.66	0.544
All Groups n=17	1.956 \pm 0.415 (1.14 - 2.62)	1.924 \pm 0.408 (1.02 - 2.52)	55.35 \pm 12.29	>0.05

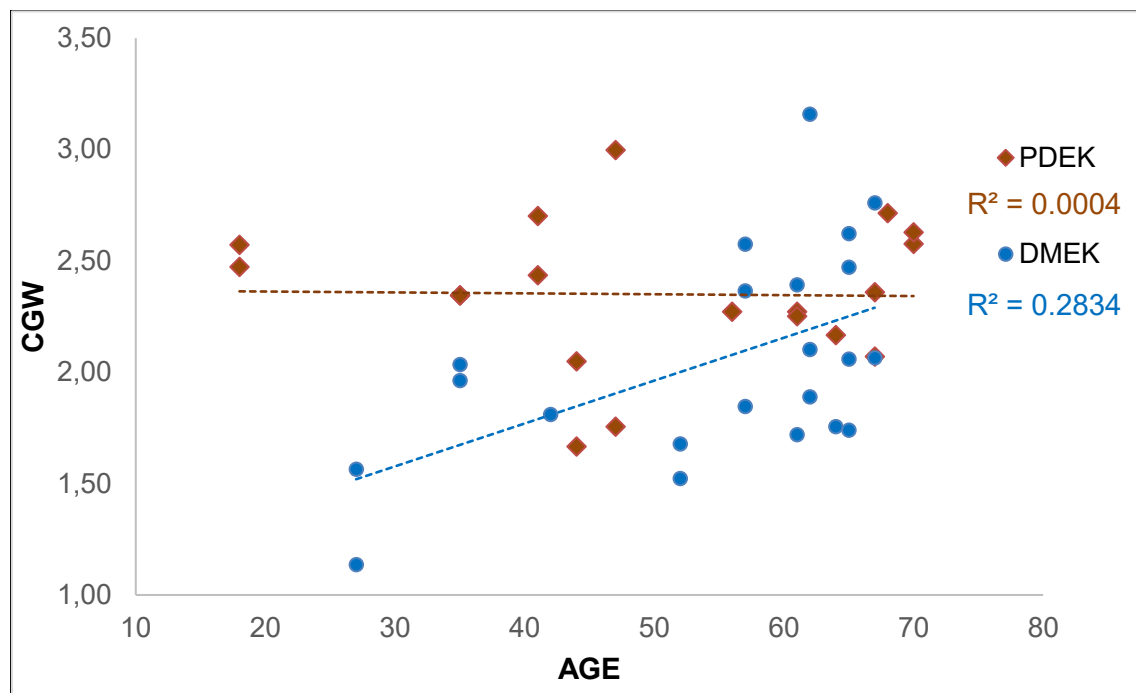


FIGURE 5 - Dispersion values, determination coefficient, and Pearson linear correlation of central graft width (CGW) and age for PDEK and DMEK grafts.

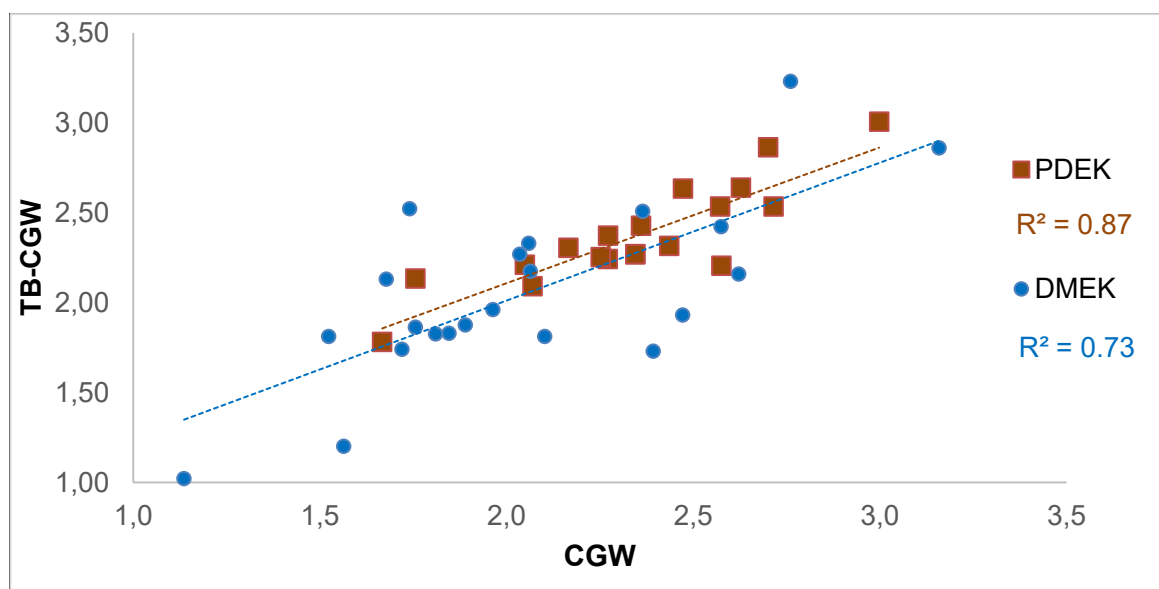


FIGURE 6 - Dispersion, determination coefficient, and Pearson linear correlation of central graft width (CGW) before and after trypan blue staining (TB-CGW) for PDEK and DMEK grafts.

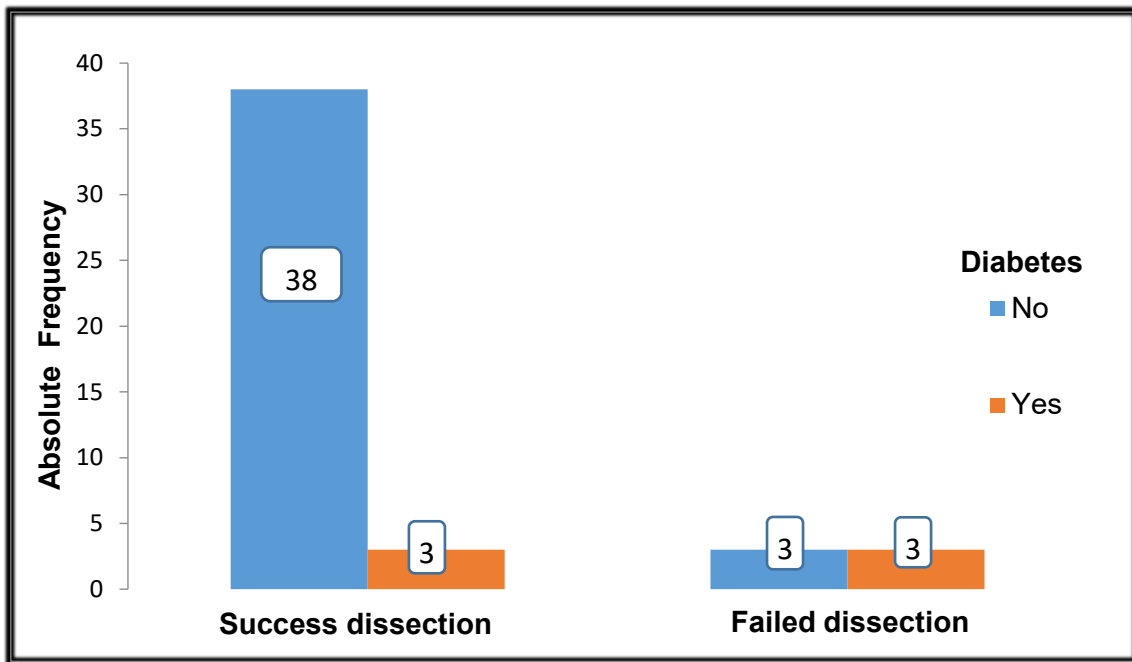


FIGURE 7 - Absolute frequency of diabetes mellitus and dissection status.

REFERENCES

- 1- Melles Gr, Ong TS, Ververs B, van der Wess J. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea* 2006; 25: 987-990.
- 2- Price MO, Price Jr FW. Descemet's membrane endothelial keratoplasty surgery: update on the evidence and hurdles to acceptance. *Curr Opin Ophthalmol* 2013 24: 329–335.
- 3- Lie JT, Birbal R, Ham L, van der Wess J, Melles GR. Donor tissue preparation for Descemet membrane endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 1578-1583.
- 4- Newman LR, DeMill DL, Zeidenweber DA, et al. Preloaded Descemet membrane endothelial keratoplasty donor tissue: surgical technique and early clinical results. *Cornea* 2018; 37: 981–986.
- 5- Agarwal A, Dua HS, Narang P, Kumar DA, Agarwal A, Jacob S, et al. Pre-Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK). *Br J Ophthalmol* 2014; 98: 1181–1185.
- 6- Tran KD, Dye PK, Odell K, et al. Evaluation and quality assessment of prestripped, preloaded Descemet membrane endothelial keratoplasty grafts. *Cornea* 2017; 36: 484–490.
- 7- Parekh M, Ruzza A, Ferrari S, et al. Preloaded tissues for Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2016; 166: 120-125.
- 9- Dua HS, Termote K, Kenawy MB, Said DG, Jayaswal R, Nubile M, Mastropasqua L, Holland S. Scrolling characteristics of pre-Descemet endothelial keratoplasty tissue: An ex vivo study. *Am J Ophthalmol* 2016; 166: 84-90. doi: 10.1016/j.ajo.2016.03.034. PMID: 27038891.

10- Bennett U, Mahmoud S, Drury D, Cavanagh HD, McCulley JP, Petroll WM, Mootha VV. Impact of donor age on corneal endothelium-Descemet membrane layer scroll formation. *Eye Contact Lens* 2015; 41(4): 236–239.

11- Mohammed I, Ross AR, Britton JO, Said DG, Dua HS. Elastin content and distribution in endothelial keratoplasty tissue determines direction of scrolling. *Am J Ophthalmol* 2018; 194: 16-25.

12- Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* 2013; 120: 1778–85.

13- Majmudar PA, Johnson L. Enhancing DMEK success by identifying optimal levels of trypan blue dye application to donor corneal tissue. *Cornea* 2017; 36(2): 217-221. doi: 10.1097/ICO.0000000000001074. PMID: 28060070.

14- John T, Patel A, Vasavada A, Singh M, Nath V, Cheng AM, Sheha H. Effect of Trypan Blue on Descemet Membrane Elasticity. *Cornea* 2016; 35(11): 1401-1403. doi: 10.1097/ICO.0000000000000986. PMID: 27538193.

15- Heinzelmann S, Huther S, Bohringer D, Eberwein P, Reinhard T, Maier P. Influence of donor characteristics on Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea* 2014; 33: 664-648.

16- Agarwal A, Agarwal A, Narang P, Kumar DA, Jacob S. Pre-Descemet endothelial keratoplasty with infant donor corneas: A prospective analysis. *Cornea* 2015; 34(8): 859-65. doi: 10.1097/ICO.0000000000000486. PMID: 26057329.

17- Dua, H., Said, D. Pre-Descemets endothelial keratoplasty: the PDEK clamp for successful PDEK. *Eye* 2017; 31: 1106–1110. <https://doi.org/10.1038/eye.2017.10>

18- Gorovoy IR, Cui QN, Gorovoy MS. Donor tissue characteristics in preparation of DMEK grafts. *Cornea* 2014; 33(7): 683–685.

19- Greiner MA, Rixen JJ, Wagoner MD, Schmidt GA, Stoeger CG, Straiko MD, Zimmerman MB, Kitzmann AS, Goins KM. Diabetes mellitus increases risk of unsuccessful graft preparation in Descemet membrane endothelial keratoplasty: a multicenter study. *Cornea* 2014; 33(11):1129-33.

20- Viana LM, Stoeger CG, Galloway JD, Terry M, Cope L, Belfort JR R, Jun AS. Risk factors for eye bank preparation failure of Descemet membrane endothelial keratoplasty Tissue. *Am J Ophthalmol* 2015; 159(5): 829–834.

21- Price, MO., Lisek, M, Feng, MT., Price, FW. Effect of donor and recipient diabetes status on Descemet membrane endothelial keratoplasty adherence and survival. *Cornea* 2017; 36(10): 1184-1188.

6 CONCLUSÕES

A viabilidade de enxertos para CEPD com córneas destinadas ao descarte foi superior a 80% com DCE viáveis e inviáveis dentro dos parâmetros desejados para o transplante. Áreas de dobras e a periferia do enxerto concentraram áreas não fluorescentes na avaliação com microscópio confocal. Foram apresentadas técnicas de preparo de enxertos para CEMD e CEPD, utilizando instrumentos cirúrgicos simples e com baixo custo. Apesar de não haver processamento de enxertos para CE por banco de olhos no Brasil este estudo apresentou dados de viabilidade que encorajam essa prática.

A dissecação de enxertos endoteliais com sistema de visualização CCE-3D possibilitou a demonstração da técnica cirúrgica com melhor identificação das estruturas, qualidade de imagem, percepção de profundidade, e capacidade didática. Em função do limitado número de tecidos disponibilizados e a curva de aprendizado com o sistema CCE-3D não foram realizadas comparações de resultados de viabilidade entre enxertos preparados com os dois tipos de microscópios. Há crescente demanda por enxertos endoteliais para CEPD, que convida técnicos de banco de olhos e oftalmologistas envolvidos a atuar no desenvolvimento dos transplantes lamelares de córnea, assim, vídeos demonstrativos utilizando imagens em 3D possibilitam o ensino de técnicas cirúrgicas complexas e atuam na redução da curva de aprendizado para iniciantes.

Neste estudo não foram observadas alterações das medidas da LCE e da ER de enxertos para CEPD e CEMD após impregnação por AT, no entanto, foram descritas características de morfometria dos enxertos endoteliais que elevam o grau de predição da dificuldade de abertura intraocular do enxerto. Por serem variáveis de fácil obtenção poderiam enriquecer o arsenal descritivo do processamento de tecidos pelo banco de olhos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais: ao oftalmologista PhD Marcelo Casella por disponibilizar o centro cirúrgico e o sistema 3D-CCE; à oftalmologista PhD Ana Paula Oguido representando o Banco de Olhos de Londrina por disponibilizar tecidos para o estudo; e ao PhD Waldiceu Verri Jr. representando a Central Multiusuário de Laboratórios de Pesquisa - Universidade Estadual de Londrina por possibilitar o uso do microscópio confocal.

REFERÊNCIAS

- 1- Fares U, Otri AM, Al-Aqaba MA, Dua HS. Correlation of central and peripheral corneal thickness in healthy corneas. *Cont Lens Anterior Eye*. 2012; 35(1):39-45.
- 2- Guilbert E, Saad A, Grise-Dulac A, Gatinel D. Corneal thickness, curvature, and elevation readings in normal 73 corneas: Combined Placido–Scheimpflug system versus combined Placido–scanning-slit system. *J Cataract Refract Surg*. 2012; 38(7):1198-206.
- 3- Nucci P, Brancato R, Mets MB, Shevell SK. Normal Endothelial Cell Density Range in Childhood. *Arch Ophthalmol*. 1990; 108(2):247-48.
- 4- Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, Lillie JH, Meyer RF, Robinson BJ, et al. Postnatal development of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986; 27(1):44-51.
- 5- Dooren BTH. The corneal endothelium reflected: Studies on surgical damage of the corneal endothelium and on endothelial specular microscopy [Internet]. Erasmus University Rotterdam; 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1765/17340>.
- 6- Melles GR, Lander F, Beekhuis WH, Remeijer L, Binder PS. Posterior lamellar keratoplasty for a case of pseudophakic bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol*. 1999; 127(3):340-1.
- 8- Price FW Jr, Price MO. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes: early challenges and techniques to enhance donor adherence. *J Cataract Refract Surg*. 2006; 32(3):411-8.
- 9- Melles GR, Lander F, Rietveld FJ. Transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea*. 2002; 21(4):415-8.
- 10- Price MO, Price FW. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue. *Ophthalmol*. 2006; 113(11):1936-42.
- 11- Bahn CF, Falls HF, Varley GA, Meyer RF, Edelhauser HF, Bourne WM. Classification of corneal endothelial disorders based on neural crest origin. *Ophthalmol*. 1984; (91):558-563.
- 12- Augusteyn RC, Nankivil D, Mohamed A, Maceo B, Pierre F, Parel JM. Human ocular biometry. *Exp Eye Res*. 2012; 102:70-5.
- 13- Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, Lillie JH, Meyer RF, Robinson BJ et al. Postnatal development of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986; 27(1):44-51.
- 14- Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41(3):660-7.
- 15- Joyce N. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2012; 95(1):16-23.

- 16- Yoshida K, Kase S, Nakayama K, et al. Involvement of p27 KIP1 in the proliferation of the developing corneal endothelium. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(7):2163.
- 17- Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(10):2930-35.
- 18- Nucci P, Brancato R, Mets MB, Shevell SK. Normal endothelial cell density range in childhood. *Arch Ophthalmol* 1990; 108(2):247-248.
- 19- Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985; 4(6):671-8.
- 20- Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38(3):779-82.
- 21- Klyce SD. 12. Endothelial pump and barrier function. *Exp Eye Res.* 2020; 198:108068.
- 22- Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015; 134:7-23.
- 23- Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984; 25(12):1402-15.
- 24- Mohammed I, Ross AR, Britton JO, Said DG, Dua HS. Elastin content and distribution in endothelial keratoplasty tissue determines direction of scrolling. *Am J Ophthalmol.* 2018; 194:16-25.
- 25- Dubbelman M, Sicam VA, Van der Heijde GL. The shape of the anterior and posterior surface of the aging human cornea. *Vision Res.* 2006; 46(6-7):993-1001.
- 26- Oliveira RC, Wilson SE. Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. *Exp Eye Res.* 2020; 197:108090.
- 27- Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmol.* 2013; 120(9):1778-85.
- 28- Dua HS, Faraj LA, Branch MJ, Yeung AM, Elalfy MS, Said DG, et al. The collagen matrix of the human trabecular meshwork is an extension of the novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Br J Ophthalmol.* 2014; 98(5):691-7.
- 29- Zhang L, Anderson MC, Liu CY. The role of corneal stroma: A potential nutritional source for the cornea. *J Nat Sci.* 2017; 3(8):e428.
- 30- Price FW Jr, Price MO. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 50 eyes: a refractive neutral corneal transplant. *J Refract Surg.* 2005; 21(4):339-45.
- 31- Bourne WM. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea.* 2001; 20(6):560-9.
- 32- Armitage WJ, Dick AD, Bourne WM. Predicting endothelial cell loss and long-term corneal graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(38):3326-31.
- 33- Albon J, Tullo AB, Aktar S, Boulton ME. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(10):2887-93.

- 34- Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C, et al. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86(3):306-10.
- 35- Thuret G, Chiquet C, Bernal F, Acquart S, Romanet JP, Mouillon M, et al. Prospective, randomized clinical and endothelial evaluation of 2 storage times for corneal donor tissue in organ culture at 31°C. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121(4):442-9.
- 36- Suwan-Apichon O, Reyes JMG, Griffin NB, Barker J, Gore P, Chuck RS. Microkeratome preparation of lamellar corneal grafts. *Eye Contact Lens*. 2006; 32(5):248-9.
- 37- Terry MA, Saad HA, Shamie N, Shah AK. Peripheral endothelial cell damage after trephination of donor tissue. *Cornea*. 2009; 28(10):1149-52.
- 38- Saad HA, Terry MA, Shamie N, Chen ES, Friend DF, Holiman JD, et al. An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and Adobe Photoshop software. *Cornea*. 2008; 27(7):818-24.
- 39- Alqudah AA, Terry MA, Straiko MD, Greiner MA, Davis-Boozer D. Immediate endothelial cell loss after penetrating keratoplasty. *Cornea*. 2013; 32(12):1587-90.
- 40- Melles GR. Posterior lamellar keratoplasty: DLEK to DSEK to DMEK. *Cornea*. 2006; 25(8):879-881.
- 41- Heinzelman S, Maier P, Reinhard T. Perspectives of posterior lamellar keratoplasty. In search of the perfect lamella. *Ophthalmol*. 2011; 108(9):825-832.
- 42- Melles GR, Wijdh RH, Nieuwendaal CP. A technique to excise the Descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004; 23(3):286-8.
- 43- Anshu A, Price MO, Price FW. Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmol*. 2012; 119(3):536-540.
- 44- Tillett CW. Posterior lamellar keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 1956; 41(3):530-3.
- 45- Melles GR, Lander F, Beekhuis WH, Remeijer L, Binder PS. Posterior lamellar keratoplasty for a case of pseudophakic bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol*. 1999; 127(3):340-1.
- 46- Price FW Jr, Price MO. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes: early challenges and techniques to enhance donor adherence. *J Cataract Refract Surg*. 2006; 32(3):411-8.
- 47- Price MO, Price FW. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue. *Ophthalmol*. 2006; 113(11):1936-42.
- 48- Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2006; 25(8):886-9.

- 49- Kobayashi A, Murata N, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki T, Sugiyama K. Evaluation of internationally shipped prestripped donor tissue for descemet membrane endothelial keratoplasty by vital dye staining. *Cornea*. 2015; 34(2):225-7.
- 50- Price MO, Price FW Jr. Endothelial cell loss after Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: Influencing factors and 2-year trend. *Ophthalmol*. 2008; 115(5):857-865.
- 51- Kim P, Yeung SN, Lichtinger A, Amiran MD, Rootman DS. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty using infant donor tissue. *Cornea*. 2012; 31(1):52-4.
- 52- Parekh M, Borroni C, Ruzza A, Levis HJ, Ferrari S, Ponzin D, et al. A comparative study on different Descemet membrane endothelial keratoplasty graft preparation techniques. *Acta Ophthalmol*. 2018; 96(6):718-26.
- 53- Vetter JM, Butsch C, Faust M, Schmidtman I, Hoffmann EM, Sekundo W, et al. Irregularity of the posterior corneal surface after curved interface femtosecond laser-assisted versus microkeratome-assisted descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2013; 32(2):118-24.
- 54- Scorgia V, Matteoni S, Scorgia GB, Scorgia G, Busin M. Pentacam assessment of posterior lamellar grafts to explain hyperopization after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Ophthalmol*. 2009; 116(9):1651-55.
- 55- Jun B, Kuo AN, Afshari NA, Carlson AN, Kim T. Refractive change after Descemet stripping automated endothelial keratoplasty surgery and its correlation with graft thickness and diameter. *Cornea*. 2009; 28(1):19-23.
- 56- Melles Gr, Ong TS, Ververs B, Van Der Wess J. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea*. 2006; 25(8):987-990.
- 57- Price MO, Price Jr FW. Descemet's membrane endothelial keratoplasty surgery: update on the evidence and hurdles to acceptance. *Curr Opin Ophthalmol*. 2013; 24(4):329-35.
- 58- Dapena I, Ham L, Melles GR. Endothelial keratoplasty: DSEK/DSEK or DMEK - the thinner the better? *Curr Opin Ophthalmol*. 2009; 20(4):299-307.
- 59 - Pereira NC, Araújo M, Pinto NT, Moreira PB, Rocha GAN, Moura GS, et al. Complicações em transplantes endoteliais realizados por estagiários de córnea. *Arq Bras Oftalmol*. 2013; 76(5):301-4.
- 60- Lie JT, Birbal R, Ham L, Van Der Wess J, Melles GR. Donor tissue preparation for Descemet membrane endothelial keratoplasty. *J Cataract Refract Surg*. 2008; 34(9):1578-83.
- 61- Bennett U, Mahmoud S, Drury D, Cavanagh HD, McCulley JP, Petroll WM, et al. Impact of donor age on corneal endothelium-Descemet membrane layer scroll formation. *Eye Contact Lens*. 2015; 41(4):236-39.

- 62- Parekh M, Ruzza A, Salvalaio G, Ferrari S, Camposampiero D, Busin M, et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty tissue preparation from donor corneas using a standardized submerged hydro-separation method. *Am J Ophthalmol*. 2014; 158(2):277-85.
- 63- Szurman P, Januschowski K, Rickmann A, Damm LJ, Boden KT, Opitz N. Novel liquid bubble dissection technique for DMEK lenticule preparation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016; 254(9):1819-23.
- 64- Agarwal A, Kumar DA. Viscoelastic assisted bubble formation in pre Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK). *DJO*. 2015; 26(1):37-39.
- 65- Anwar M, Teichmann KD. Big-bubble technique to bare Descemet's membrane in anterior lamellar keratoplasty. *J Cataract Refract Surg*. 2002; 28(3):398-403.
- 66- Busin M, Scorcia V, Patel AK, Salvaio G, Pozin D. Pneumatic dissection and storage of donor endothelial tissue for Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmol*. 2010; 117(8):1517-20.
- 67- Agarwal A, Dua HS, Narang P, Kumar DA, Agarwal A, Jacob S, et al. Pre-Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK). *Br J Ophthalmol*. 2014; 98(9):1181-85.
- 68- Goweida MB, Abuelkheir A, El-Menawy WAR, Mahmoud S. Dynamics of Big Bubble Formation During Deep Anterior Lamellar Keratoplasty in Eyes with Advanced Keratoconus. *Clin Ophthalmol*. 2020; 14:4305-10.
- 69- Altaan SL, Gupta A, Sidney LE, Elalfy MS, Agarwal A, Dua HS. Endothelial cell loss following tissue harvesting by pneumodissection for endothelial keratoplasty: an ex vivo study. *Br J Ophthalmol*. 2015; 99(5):710-3.
- 70- Dua HS, Said DG. Pre-Descemets endothelial keratoplasty: the PDEK clamp for successful PDEK. *Eye*. 2017; 31(7):1106-10.
- 71- Heinzelmann S, Huther S, Bohringer D, Eberwein P, Reinhard T, Maier P. Influence of donor characteristics on Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2014; 33(6):644-48.
- 72- Deng SX, Sanchez PJ, Chen L. Clinical outcomes of Descemet membrane endothelial keratoplasty using eye bank-prepared tissues. *Am J Ophthalmol*. 2014; 159(3):590-6.
- 73- Dua HS, Termote K, Kenawy MB, Said DG, Jayaswal R, Nubile M, et al. Scrolling Characteristics of Pre-Descemet Endothelial Keratoplasty Tissue: An Ex Vivo Study. *Am J Ophthalmol*. 2016; 166:84-90.
- 74- Parekh M, Ruzza A, Ferrari S, Busin M, Ponzin D. Preloaded tissues for Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2016; 166:120-5.
- 75- John T, Patel A, Vasavada A, Singh M, Nath V, Cheng AM, et al. Effect of trypan blue on Descemet's membrane elasticity. *Cornea*. 2016; 35(11):1401-03.
- 76- Parekh M, Baruzzo M, Favaro E, Borroni D, Ferrari S, Ponzin D, et al. Standardizing Descemet membrane endothelial keratoplasty graft preparation method in the eye bank-


- experience of 527 Descemet's membrane endothelial keratoplasty tissues. *Cornea*. 2017; 36(12):1458-66.
- 77- Ide T, Yoo SH, Kymionis GD, Goldman JM, Perez VL, O'Brien TP. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty: effect of anterior lamellar corneal tissue -on/-off storage condition on Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty donor tissue. *Cornea*. 2008; 27(7):754-7.
- 78- Szurman P, Januschowski K, Rickmann A, Damm LJ, Boden KT, Opitz N. Novel liquid bubble dissection technique for DMEK lenticule preparation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016; 254(9):1819-23.
- 79- Pipparelli A, Thuret G, Toubreau G, He Z, Piselli S, Lefe'vre S, et al. Pan-corneal endothelial viability assessment: Application to endothelial grafts pre-dissected by eye banks. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52(8):6018-25.
- 80- Bhogal M, Balda MS, Matter K, Allan BD. Global cell-by-cell evaluation of endothelial viability after two methods of graft preparation in Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol*. 2016; 100(4):572-8.
- 81- Eckardt C, Paulo EB. Heads-up surgery for vitreoretinal procedures: an experimental and clinical study. *Retina*. 2016; 36(1):137-47.
- 82- Romano MR, Cennamo G, Comune C, Cennamo M, Ferrara M, Rombetto L, et al. Evaluation of 3D heads-up vitrectomy: outcomes of psychometric skills testing and surgeon satisfaction. *Eye*. 2018; 32(6):1093-98.
- 83- Kunikata H, Abe T, Nakazawa T. Heads-up macular surgery with a 27-gauge microincision vitrectomy system and minimal illumination. *Case Rep Ophthalmol*. 2016; 7(3):265-9.
- 84- Adam MK, Thornton S, Regillo CD, Park C, Ho AC, Hsu J. Minimal endoillumination levels and display luminous emittance during three-dimensional heads-up vitreoretinal surgery. *Retina*. 2017; 37(9):1746-9.
- 85- Weinstock RJ. First clinical use of on-screen 3-D image guidance templates during small-incision cataract surgery. In: American Society of Cataract and Refractive Surgery Annual Meeting. Boston; 2010.
- 86- Mohamed YH, Uematsu M, Inoue D, Kitaoka T. First experience of nDASEK with heads-up surgery: a case report. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(19):e6906.
- 87- Albon J, Tullo AB, Aktar S, Boulton ME. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41(10):2887-93.
- 88- Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C. et al. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86(3):306-10.

- 89- Newman LR, DeMill DL, Zeidenweber DA, Mayko ZM, Bauer AJ, Tran KD, et al. Preloaded Descemet membrane endothelial keratoplasty donor tissue: Surgical Technique and early clinical results. *Cornea*. 2018; 37(8):981-6.
- 90- Terry MA, Shamie N, Chen ES, Phillips PM, Hoar KL, Friend DJ. Precut tissue for Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: vision, astigmatism, and endothelial survival. *Ophthalmol*. 2009; 116(2):248-56.
- 91- Terry MA. Endothelial keratoplasty: a comparison of complication rates and endothelial survival between precut tissue and surgeon-cut tissue by a single DASAEEK surgeon. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2009; 107:184-91.
- 92- Ruzza A, Parekh M, Ferrari S, Salvalaio G, Nahum Y, Bovone C, et al. Preloaded donor corneal lenticules in a new validated 3D printed smart storage glide for Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol*. 2015; 99(10):1388-95.
- 93- Palioura S, Colby K. Outcomes of Descemet stripping endothelial keratoplasty using eye-bank prepared preloaded grafts. *Cornea*. 2017; 36(1):21-5.
- 94- Holiman JD, Stoeger CG, Galloway JD, Straiko M. An Eye Bank DMEK tissue preparation program for corneas stored at 4°C. In: Parekh Mohit, Stefano Ferrari DP, eds. *Eye Banking: Changing Face of Corneal Transplantation*. New York, NY: Nova Biomedical; 2015. P. 123-39.
- 95- Veldman PB, Dye PK, Holiman JD, Mayko ZM, Sáles CS, Straiko MD, et al. The S-stamp in Descemet membrane endothelial keratoplasty safely eliminates upside-down graft implantation. *Ophthalmol*. 2016; 123(1):161-4.
- 96- Veldman PB, Dye PK, Holiman JD, Mayko ZM, Sáles CS, Straiko MD, et al. Stamping an S on DMEK donor tissue to prevent upside-down grafts: laboratory validation and detailed preparation technique description. *Cornea*. 2015; 34(9):1175-78.
- 97- Keenan TD, Carley F, Yeates D, Jones MN, Rushton S, Goldacre MJ. Trends in corneal graft surgery in the UK. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(4):468-72.
- 98- Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol*. 2016; 134(2):167-73.
- 99- Chen C, Solar SJ, Lohmeier J, Terrin S, Baliga S, Wiener BG, et al. Viability of preloaded Descemet membrane endothelial keratoplasty grafts with 96-hour shipment. *BMJ Open Ophthalmol*. 2021; 6(1):e000679.
- 100- Barnes K, Chiang E, Chen C, Lohmeier J, Christy J, Chaurasia A, et al. Comparison of Tri-folded and Scroll-based Graft Viability in Preloaded Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea*. 2019; 38(3):392-6.
- 101- Vieira S. *Bioestatística tópicos avançados*. São Paulo: Elsevier Brasil; 2011.
- 102- Levene H. Robust tests for the equality of variance. In: Olkin I (Ed.) *Contributions to Probability and Statistics*, Palo Alto, California: Stanford University Press; 1960. P. 278-92.

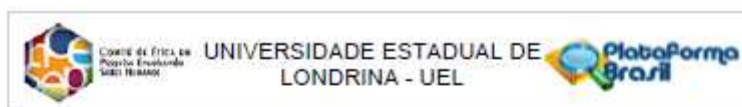
103- Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality. *Biometrika*, Great Britain. 1965; 52(3)591-611.

ANEXOS

ANEXO A FOLHA DE ROSTO ENVIADA À PLATAFORMA BRASIL

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			
1. Projeto de Pesquisa: Perda ocular endotelial no preparo da lâmina posterior para a cirurgia DMEK. Uma nova técnica com injeção intraestromal de Solução salina balanceada.			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 30			
3. Área Temática:			
4. Área de Conhecimento: Grande Área 4 - Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Rodrigo Bueno do Prado			
6. CPF: 041.446.379-05	7. Endereço (Rua, n.º): EURICO HUMING GLEBA FAZENDA PALHANO 255 apt 702 torre 1 LONDREIRA PARANA 80050454		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: 43998417000	10. Outro Telefone:	11. Email: barprado@hotmail.com
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela conclusão científica do projeto acima. Tenho ciência que esse formulário será anexado ao projeto devidamente assinado por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>05, 04, 2019</u>		Dr. Rodrigo do Prado CRM PR 24859 OAB/PR 101214 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Universidade Estadual de Londrina - UEL	13. CNPJ:	14. Unidade/Órgão: CCS - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Stricto sensu	
15. Telefone: (43) 3371-2378	16. Outro Telefone:		
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>Waldiceu Aparecido Verrini Júnior</u>	CPF: <u>025.652.899-36</u>		
Cargo/Função: <u>Coordenador PPG em Ciências da Saúde</u>	Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Júnior Coord. do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Assinatura		
Data: <u>12, 04, 19</u>			
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			

ANEXO B PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perda celular endotelial no preparo da lamela posterior para a cirurgia DMEK: Uma nova técnica com Injeção Intraestromal de Solução salina balanceada.

Pesquisador: Rodrigo Bueno do Prado

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 66172518.2.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Stricto sensu

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.799.149

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um recurso apresentado pelo pesquisador indicando que a pesquisa ainda não foi iniciada como apontado no parecer inicial de reprovação devido a data apresentada no cronograma da pesquisa, o pesquisador relata que iniciará a pesquisa após o parecer de aprovação. Trata-se de um projeto de doutorado do Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde. As cómeas captadas pelo Banco de Olhos de Londrina e destinadas ao descarte por motivos de sorologia viral positiva do doador serão objetos deste estudo. Serão incluídas somente as cómeas que permitirem a contagem celular endotelial (CCE) no microscópio especular da marca Topcon.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a contagem celular endotelial de enxertos corneanos antes e após a dissecação da lamela posterior com Solução salina balanceada.

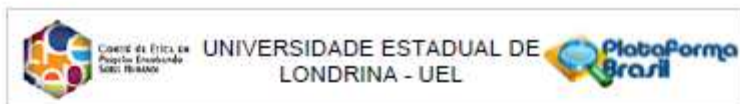
Objetivo Secundário:

Descrever uma nova técnica de preparo da lamela posterior para DMEK. Investigar a viabilidade do enxerto pré-cortado em meio de Optisol após preservação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Com relação aos riscos o pesquisador descreve que: Durante a injeção da solução salina balanceada no estroma corneano observa-se a dissecação da lamela posterior podendo

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário
 UF: PR Município: LONDRINA CEP: 86.057-970
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep208@uel.br



Continuação do Parecer: 2.796.149

acidentalmente ocasionar trauma à lamela posterior.

Com relação aos benefícios, relata que: "O enxerto pré-cortado utilizando esta nova técnica afunda em meio de preservação e permite ao banco de olhos realizar a distribuição do tecido precortado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou folha de rosto devidamente preenchida e assinada. Apresentou declaração de concordância da Instituição co-participante. Apresentou termo de sigilo e confidencialidade assinado. O cronograma apresentado não está detalhado e a data da coleta de dados é 19/02/2018, foi solicitada alteração, no entanto por se tratar de recurso não foi possível alterar, mas em anexo a Plataforma encontra-se o cronograma correto e atualizado. O orçamento é de R\$ 510.00 e será custeado pelo próprio pesquisador.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

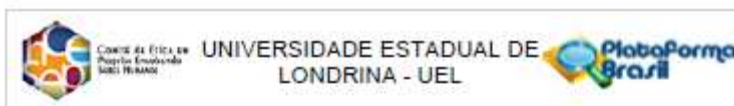
Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Recurso do Parecer	recurso.pdf	02/08/2018 16:43:44		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Recurso2.docx	02/08/2018 16:43:35	Rodrigo Bueno do Prado	Aceito
Outros	informacoes_basicas_projeto2.docx	02/08/2018 16:41:30	Rodrigo Bueno do Prado	Aceito
Recurso do Parecer	recurso.pdf	21/07/2018 17:57:33		Aceito
Outros	oficio cep.pdf	21/07/2018 17:56:36	Rodrigo Bueno do Prado	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-6455 E-mail: cep208@uel.br



Continuação do Parecer: 2.796.149

Cronograma	cronograma.docx	21/07/2018 17:55:30	Rodrigo Bueno do Prado	Aceito
Recurso do Parecer	recurso.pdf	03/07/2018 00:21:40		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1076432.pdf	20/04/2018 16:11:03		Aceito
Declaração de Pesquisadores	termosiglo.pdf	20/04/2018 16:10:01	Rodrigo Bueno do Prado	Aceito
Outros	scan0004.pdf	20/04/2018 16:09:41	Rodrigo Bueno do Prado	Aceito
Folha de Rosto	scan0001.pdf	20/04/2018 16:06:13	Rodrigo Bueno do Prado	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	scan0002.pdf	20/04/2018 16:05:51	Rodrigo Bueno do Prado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_doutorado_rodrigo.docx	12/03/2018 12:13:06	Rodrigo Bueno do Prado	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 03 de Agosto de 2018

Assinado por:
Adriana Lourenço Soares
(Coordenador)

Endereço: LABEHC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
UF: PR Município: LONDRINA E-mail: cep208@uel.br
Telefone: (43)3371-5455

ANEXO C NORMAS PARA DISSERTAÇÃO OU TESE

Programa de Pós Graduação (PG) em Ciências da Saúde.

Você poderá encontrar na secretaria de PG várias dissertações e teses para consulta como modelo.

A dissertação ou tese deverá ser formatada para Folha A4; Margens de 2,5 cm. Caso aluno/orientador desejem, a qualificação pode ser impressa em frente e verso.

A apresentação escrita da dissertação ou tese deverá seguir o seguinte formato e ordem:

1) Elementos pré textuais: Fonte: Arial 11; Espaçamento: 1,5;
OBS: Para o título da dissertação ou tese nos elementos pré-textuais (capa, folha de rosto, folha de aprovação) utilizar Fonte Arial 14; Espaçamento 1,5.

2) Resumo: Fonte: Arial 11; Espaçamento: simples;

3) Abstract: Fonte: Arial 11; Espaçamento: simples;

4) Introdução: Fonte: Arial 11; Espaçamento: 1,5;

5) Objetivos: Fonte: Arial 11; Espaçamento: 1,5;

6) Material e métodos: Fonte: Arial 11; Espaçamento: 1,5;

7) Resultados e Discussão: Artigo(s) científico(s) referente(s) ao trabalho que será(ão) ou foi(foram) submetido(s) para publicação.

Utilizar as normas do periódico escolhido para submissão do trabalho com todos os elementos exigidos para publicação.

Obs: É preferível que o texto esteja na língua inglesa. Entretanto, a língua portuguesa pode ser utilizada caso o aluno e/ou orientador não estejam seguros quanto à qualidade do texto.

8) Considerações finais ou conclusões: Fonte: Arial 11; Espaçamento: 1,5;

9) Referências bibliográficas citadas nos itens 4 e 6: utilizar qualquer formato de referência bibliográfica (ex., ABNT, Vancouver). Entretanto, uma vez escolhido o formato, todas as referências deverão ser apresentadas de forma harmonizada. Fonte: Arial 11; Espaçamento: 1,5.

10) Anexos