

# Análisis comparativo del estudio morfológico del endotelio corneal mediante dos microscopios especulares: CSO y Noncom Robo

David P Piñero Llorens - O.C. n° 11.103 - Ana Belén Plaza Puche

El análisis morfológico del endotelio corneal resulta esencial en ciertos procedimientos oftalmológicos. El uso de la microscopía especular para este fin está ampliamente establecido, habiendo disponibilidad de diversos modelos comerciales de microscopio con diferentes prestaciones. En el estudio que se describe a continuación se ha llevado a cabo un análisis comparativo de dos microscopios especulares para 3 parámetros que definen la morfología endotelial: la densidad endotelial, el coeficiente de variación y el porcentaje de hexagonalidad. Con uno de los microscopios el marcaje de las células se llevaba a cabo manualmente, mientras que con el otro el procedimiento estaba totalmente automatizado. Se ha puesto de manifiesto la concordancia de las mediciones de la densidad y el coeficiente de variación obtenidas con ambos instrumentos, existiendo una falta de concordancia en el estudio de la hexagonalidad.

## INTRODUCCIÓN

La existencia de un endotelio corneal completamente sano y funcional es imprescindible para que la córnea mantenga su transparencia óptica<sup>1</sup>. Una de las peculiaridades del endotelio corneal es la incapacidad de regeneración celular que presenta. Los espacios residuales que dejan las células muertas son cubiertos gracias al cambio de tamaño de las células adyacentes, con el fin de lograr mantener una barrera celular íntegra. Se ha demostrado que existe una pérdida celular fisiológica asociada a la edad, la cual va induciendo un cambio morfológico celular<sup>2-6</sup>. Dicho cambio se manifiesta por un aumento progresivo del tamaño celular, denominado pleomorfismo, y un cambio del perfil poligonal celular, observándose una reducción del porcentaje de células hexagonales<sup>2-6</sup>. Además del propio fenómeno del envejecimiento, existen otros factores que pueden acelerar y acusar las pérdidas y cambios morfológicos endoteliales, como son la hipoxia (por ejemplo, por lentes de contacto)<sup>7,8</sup> y el trauma quirúrgico<sup>9-12</sup>.

Por ello, es imprescindible en ciertos seguimientos terapéuticos la monitorización de la morfología corneal con el tiempo. Una de las aplicaciones más claras de dicha monitorización es el seguimiento de los pacientes con implante de una lente intraocular fáquica de cámara anterior. En casos de alta miopía o córnea no sana e inestable, se suele recurrir al implante de una lente intraocular en la cámara anterior del ojo con la potencia adecuada para la compensación del defecto refractivo existente. Dichas lentes pueden ser de apoyo angular o de apoyo iridiano. Los modelos de estas lentes han ido evolucionando con el tiempo con el fin de conseguir implantes altamente biocompatibles y que proporcionen el mayor respeto a las estructuras de la cámara anterior. Los modelos de primera generación que surgieron el siglo pasado no se hallaban exentos de complicaciones, siendo una de las más importantes la pérdida celular endotelial<sup>13-15</sup>. Este hecho era debido al daño mecánico generado por el roce continuo o intermitente de los bordes de la lente con el endotelio. Actualmente con los nuevos modelos existentes se han lo-

grado diseños más fisiológicos, aunque hace falta una mayor cantidad de estudios para plazos de seguimiento más extensos.

Existen varios métodos de análisis morfológico del endotelio, tales como la microscopía especular<sup>16</sup> o la microscopía confocal<sup>17</sup>. El objetivo del presente estudio es comparar y verificar la equivalencia en las medidas obtenidas por medio de dos modelos de microscopios especulares de no contacto existentes actualmente en el mercado: Noncom Robo y CSO.

## MÉTODOS

En el presente estudio se ha incluido un total de 25 ojos correspondientes a 14 pacientes con edades comprendidas entre los 24 y los 53 años (edad media:  $35.88 \pm 7.75$  años). En la muestra existía una predominancia de mujeres (80%) frente a hombres (20%). En todos los ojos se realizó un análisis morfológico endotelial empleando dos microscopios especulares de no contacto diferentes: Noncom Robo (Konan Camera

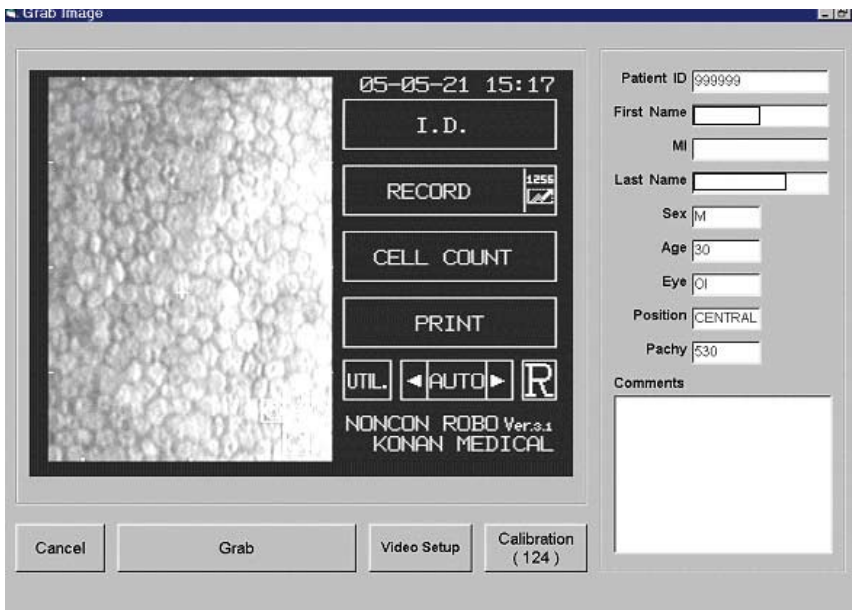


Figura 1. Pantalla principal del software Kss-300 de Konan Medical, el cual permite el análisis morfológico del endotelio corneal a partir de las imágenes obtenidas con el microscopio especular Noncom Robo.

Research Institute, Hyogo, Japan) y CSO Specular Microscope (CSO, Firenze, Italy). Todas las medidas fueron llevadas a cabo por un mismo examinador entrenado y con experiencia en el manejo de ambos instrumentos. Ninguno de los ojos incluidos presentaba patología corneal o intraocular, ni tampoco había sido intervenido de cirugía corneal o intraocular que pudiera haber modificado de manera significativa el perfil endotelial.

El microscopio especular Noncom Robo es un microscopio de no contacto con cámara incorporada que permite el examen del endotelio corneal sin necesidad de ningún objeto que contacte con el ojo. Dicho microscopio de no contacto se halla conectado a una computadora en la que se halla instalado un software específico para el análisis de las imágenes que se van adquiriendo. Se trata del software KSS-300 de Konan Medical, el cual presenta

varias opciones, como el conteo manual y semiautomático de las células endoteliales para el cálculo de la densidad correspondiente.

El microscopio especular CSO presenta un mecanismo parecido al instrumento anterior, incluyendo un método automático de enfoque con el fin de lograr la mejor imagen sin necesidad de ir realizando ajustes posteriores (Figura 2). En este caso, la cámara y la computadora se hallan integradas en una única unidad. Una de las prestaciones que ofrece el sistema es la realización de un conteo celular automático de precisión, que evita la tediosa maniobra del conteo manual. De todos modos, los resultados del conteo automático se pueden editar mediante el software incorporado en caso de que se detecte algún error.

En todos los casos se llevó a cabo primero la medida con el sistema manual del microscopio Noncom Robo, para posteriormente pasar al sistema automático del equipamiento CSO. De este modo, se lograba evitar que el conteo manual se pudiera ver sesgado debido a que el examinador conocía las lecturas automáticas. Para el conteo celular manual siempre se marcaba como mínimo un total de 80 células.

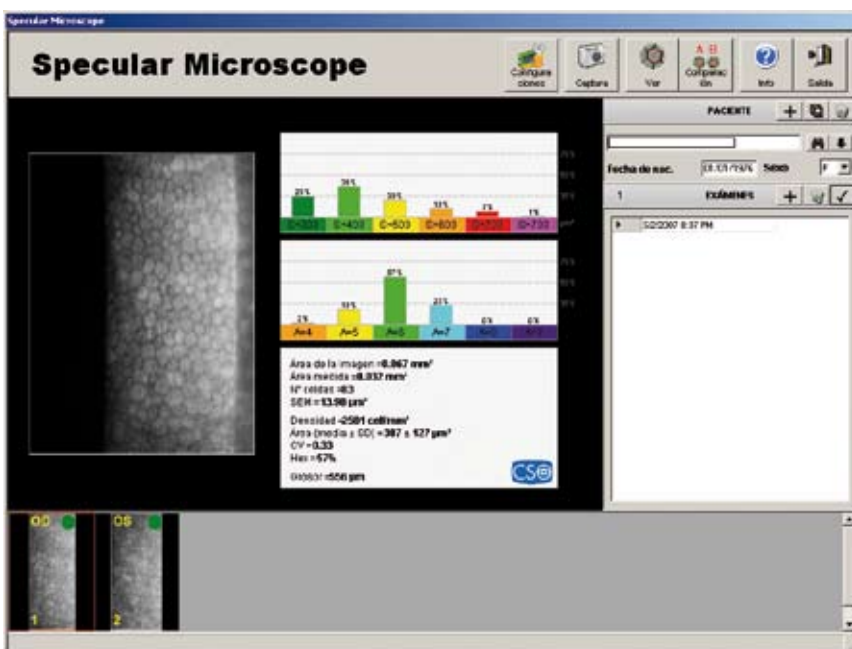


Figura 2. Pantalla principal del software integrado en el sistema CSO Specular Microscope de CSO, el cual permite el análisis morfológico del endotelio corneal a partir de las imágenes obtenidas con el microscopio especular.

Con cada microscopio especular se determinaron los siguientes parámetros morfológicos: densidad endotelial, coeficiente de variación y porcentaje de hexagonalidad. La densidad endotelial equivale al número de células existentes en un milímetro cuadrado de endotelio. Dependiendo de la edad del paciente, la media debe superar o rondar las 2.000 células/mm<sup>2</sup>.

El coeficiente de variación caracteriza la variabilidad existente en lo que respecta al tamaño celular, y se calcula como el cociente entre la desviación estándar de las medidas y su valor medio. Por último, la hexagonalidad nos indica el porcentaje de células hexagonales existentes en el área analizada, el cual debe superar idealmente el 50%.

Para el análisis estadístico se empleó el software SPSS para

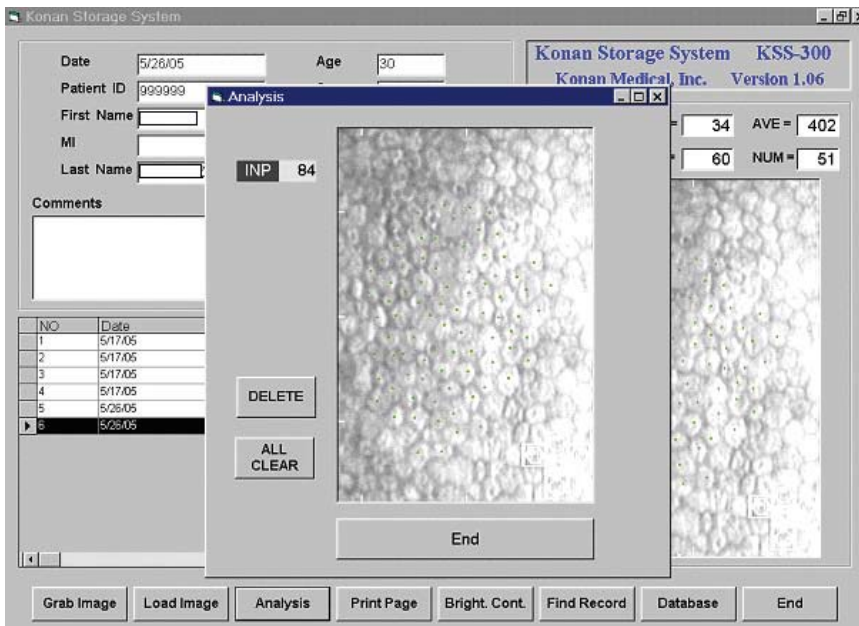


Figura 3. Contaje manual endotelial realizado con el software Kss-300 sobre imágenes obtenidas con el microscopio especular Noncom Robo.

Windows versión 11.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Todas las variables del estudio se hallaban distribuidas normalmente, lo cual fue comprobado por medio del test de Kolmogorov-Smirnov. Para la comparativa entre instrumentos se empleó el test estadístico t de Student para muestras no pareadas, siendo considerado el nivel de significación estadística para valores de  $p > 0.05$ .

La concordancia entre las mediciones obtenidas con ambos instrumentos fue estudiada por medio del análisis de Bland & Altman. Este análisis es de carácter gráfico, y en él las diferencias entre instrumentos para un determinado parámetro son representadas frente al valor medio entre ambas técnicas. De este modo, se podrán visualizar los límites de concordancia, definidos como 1.96 veces la desviación estándar de las

diferencias, e interpretar si resultan clínicamente relevantes o no<sup>18</sup>.

Adicionalmente, se han determinado las correlaciones correspondientes para todos los parámetros medidos entre técnicas.

## RESULTADOS

En la **Tabla 1** se muestran esquematizados los resultados obtenidos. Como se puede apreciar en la tabla, la densidad endotelial media con el microscopio Noncom Robo resultó ser de  $2598.00 \pm 275.71$  cel/mm<sup>2</sup>, mientras que con el sistema CSO la densidad media fue de  $2699.24 \pm 262.62$  cel/mm<sup>2</sup>. La diferencia entre las densidades obtenidas con ambos instrumentos no resultó estadísticamente significativa (t Student no pareadas  $p=0.553$ ). Tampoco resultaron estadísticamente significativas las diferencias en el coeficiente de variación y en el porcentaje de hexagonalidad entre instrumentos (t Student no pareadas; coeficiente de variación  $p=0.141$ , hexagonalidad  $p=0.460$ ).

Las **Figuras 5, 6 y 7** muestran los diagramas de Bland & Altman para los 3 parámetros endoteliales estudiados. La diferencia media entre Noncom Robo y CSO para la densidad endotelial fue de  $-101.24 \pm 203.86$  células/mm<sup>2</sup>, existiendo un rango de concordancia entre instrumentos de  $399.57$  células/mm<sup>2</sup> (1.96 veces la desviación estándar de las diferencias). En lo que respecta al coeficiente de variación la diferencia media resultó ser de  $3.08 \pm 4.45$ , existiendo un rango de concordancia entre instrumentos para este parámetro de  $8.72$ . Por último, para el porcentaje de hexagonalidad la diferencia media fue de  $-0.12 \pm 8.57\%$ , existiendo un rango de concordancia de  $16.80\%$ .

Todos los coeficientes de correlación entre instrumentos (coeficiente de Pearson) obtenidos para cada parámetro endotelial resultaron estadísticamente significativos (densidad endotelial  $r=0.714$   $p<0.001$ ; coeficiente variación  $r=0.45$   $p=0.012$ ; hexagonalidad  $r=0.34$   $p=0.048$ ). De todos modos, la relación entre los porcentajes

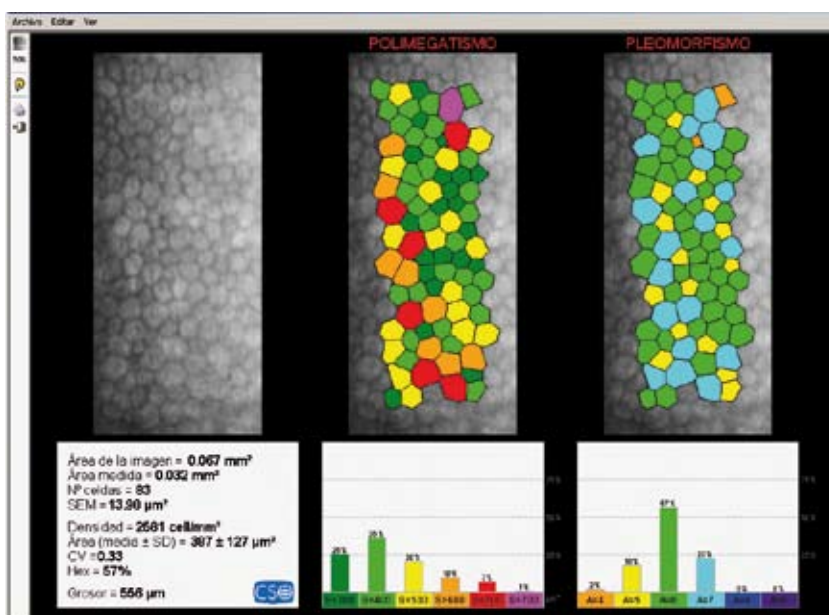


Figura 4. Contaje automático llevado a cabo mediante el software del sistema CSO Specular Microscope. Adicionalmente este software realiza un análisis gráfico del pleomorfismo y polimegatismo, como se puede apreciar en la figura.

	Densidad endotelial	Coefficiente de variación	Hexagonalidad
<b>Noncom Robo</b>	2598.00 ± 275.71 (2151,3279)	35.92 ± 4.45 (26,42)	55.72 ± 8.21 (44,75)
<b>CSO</b>	2699.24 ± 262.62 (2313,3198)	32.84 ± 4.02 (26,45)	55.84 ± 6.46 (44,68)

Tabla 1. Sumario de los resultados obtenidos con los dos microscopios especulares analizados para diferentes parámetros que definen la morfología endotelial corneal.

de hexagonalidad obtenidos con ambos instrumentos resultó débil.

### DISCUSIÓN

El análisis del endotelio corneal es un procedimiento fundamental en el seguimiento de ciertos procesos quirúrgicos refractivos, especialmente tras el implante de lentes intraoculares fáquicas. Se ha demostrado en el postoperatorio inicial tras el implante de diversos modelos de lente fáquica de cámara anterior que existe una reducción de la densidad endotelial<sup>19-26</sup>. Dicha reducción se explica en cierto modo por el ligero trauma inducido en la maniobra quirúrgica. La cuestión es comprobar que dicho trauma y la consecuente pérdida endotelial no continúa en el tiempo, puesto que si así fuera nos estaría indicando que el problema lo ocasiona la lente. Los modelos de lente fáquica actuales están creados con la finalidad de no generar roce ni trauma mecánico con el endo-

telio, pero puede ocurrir que la lente no se halle perfectamente posicionada o que el tamaño de la misma no sea el adecuado. Por ello, es imprescindible realizar un seguimiento endotelial en el postoperatorio. Empiezan a aparecer estudios a largo plazo que analizan la pérdida endotelial con estas lentes y se ha demostrado que la mayor pérdida se produce en el postoperatorio inmediato<sup>25</sup>.

Parece claro que es imprescindible el análisis endotelial para ciertos procesos oftalmológicos, pero a su vez es necesario disponer de un sistema de alta precisión, fiable. La aplicación de la microscopia especular para la obtención de imágenes de alta resolución del endotelio sobre las que poder realizar un conteo celular de precisión supuso un gran avance en el campo de la oftalmología<sup>17,27</sup>. Por medio de estos instrumentos se pueden realizar monitorizaciones exhaustivas del endotelio corneal. Los sistemas iniciales requerían la realización del conteo

manualmente, pero posteriormente se han desarrollado sistemas semiautomáticos<sup>28,29</sup> que realizan estimaciones del conteo de una manera rápida y sin la necesidad de que las células sean marcadas una a una. El problema de algunas de esas estimaciones es la pérdida de algo de precisión. Finalmente, surgieron los sistemas automáticos, como el que se halla acoplado al microscopio confocal, que en cuestión de segundos proporcionan automáticamente un conteo celular de precisión<sup>16</sup>.

En el presente trabajo hemos comparado los resultados de diversos parámetros endoteliales obtenidos a partir del marcado celular manual del Noncom Robo y también a partir del sistema automático del microscopio especular CSO. Para los 3 parámetros analizados (densidad endotelial, coeficiente de variación, hexagonalidad), la variabilidad obtenida resulta bastante similar. Los valores medios del coeficiente de variación y del porcentaje de hexagonalidad obtenidos con cada uno de los dos microscopios especulares estudiados resultan significativamente similares. En cambio, el procedimiento automático tiende a generar valores de densidad endotelial algo superiores.

El análisis de Bland & Altman muestra para la densidad endotelial un rango de concordancia aceptable, el cual coincide con la repetibilidad intraobservador para la medida con el micros-

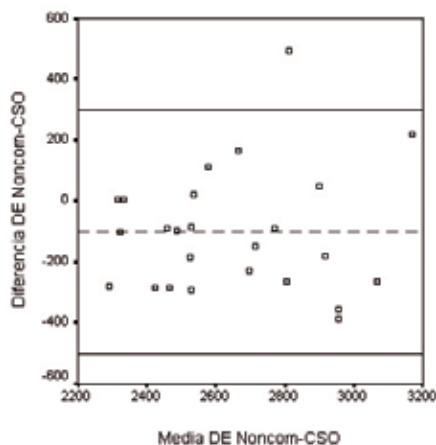


Figura 5. Gráfica de Bland & Altman para la comparativa de densidad endotelial entre ambos instrumentos. Se muestra el rango de concordancia (1.96 desviación estándar) limitado por la línea superior e inferior.

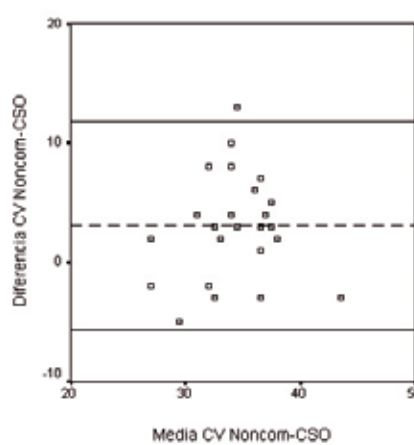


Figura 6. Gráfica de Bland & Altman para la comparativa del coeficiente de variación entre ambos instrumentos. Se muestra el rango de concordancia (1.96 desviación estándar) limitado por la línea superior e inferior.

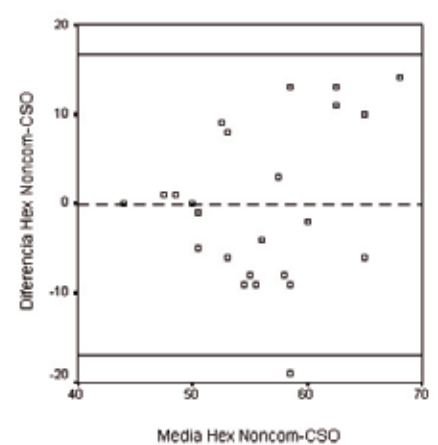


Figura 7. Gráfica de Bland & Altman para la comparativa de hexagonalidad entre ambos instrumentos. Se muestra el rango de concordancia (1.96 desviación estándar) limitado por la línea superior e inferior.

copio especular Noncom Robo ya analizada en un estudio previo<sup>30</sup>. Por lo tanto, la concordancia entre ambos métodos para la densidad endotelial se puede considerar clínicamente no relevante, y también que ambos métodos son intercambiables para la medida de la densidad endotelial.

En lo que respecta al coeficiente de variación la concordancia obtenida es aun mayor, existiendo un rango de concordancia muy bueno que nos indica un grado de intercambiabilidad elevado. El problema reside en el porcentaje de hexagonalidad, existiendo una ligera mayor variabilidad para el microscopio Noncom Robo. Para este parámetro el rango de concordancia resulta elevado, ya que nos indica que son posibles diferencias para el porcentaje de hexagonalidad entre los instrumentos de hasta 17% aproximadamente, hallándose en el límite de la relevancia clínica. Por lo tanto, los microscopios especulares Noncom Robo y CSO resultan mínimamente intercambiables para la medida de la hexagonalidad.

Por lo tanto, el procedimiento automático de análisis endotelial proporciona valores de densidad endotelial y coeficiente de variación equivalentes al procedimiento de contaje manual. Para el porcentaje de hexagonalidad el microscopio CSO realiza un análisis más exhaustivo y con menor variabilidad que el microscopio Noncom Robo, no resultando ambas medidas intercambiables en todos los casos.

## CONCLUSIONES

El análisis del endotelio corneal por medio de un microscopio especular es un procedimiento sencillo y muy útil en la práctica clínica. Resulta imprescindible para valorar la evolución de ciertos procedimientos quirúrgicos refractivos, tales como el implante de lentes fáquicas, la cirugía de catarata o el transplante de córnea.

Existen diversos modelos de microscopio especular que permiten el análisis morfológico endotelial, unos mediante contaje manual y otros mediante contaje automático. En el presente estudio hemos comparado

## REFERENCIAS

1. Stocker FW. The endothelium of the cornea and its clinical implications. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1953; 51: 669-78.
2. Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 2005; 81: 829-38.
3. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 779-82.
4. Moller-Pedersen T. A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging. *Cornea* 1997; 16: 333-8.
5. Yee RW, Matsuda M, Schultz RQ, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985; 4: 671-8.
6. Sherrard ES, Novakovic P, Speedwell L. Age-related changes of the corneal endothelium and stroma as seen in vivo by specular microscopy. *Eye* 1987; 1: 197-203.
7. Epstein RJ, Fernandes A, Gammon JA. The correlation of aphakia in infants with hydrogel extended-wear contact lenses. *Corneal studies. Ophthalmology* 1988; 95: 1102-6.
8. Matsuda M, Inaba M, Suda T, MacRae SM. Corneal endothelial changes associated with aphakic extended contact lens wear. *Arch Ophthalmol* 1988; 106: 70-2.
9. Lundberg B, Jonsson M, Behndig A. Postoperative corneal swelling correlates strongly to corneal endothelial loss after phacoemulsification cataract surgery. *Am J Ophthalmol* 2005; 139: 1035-41.
10. Hayashi K, Hayashi H, Nakao F, Hayashi F. Risk factors for corneal endothelial injury during phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 1996; 22: 1079-84.
11. Musch DC, Meyer RF, Sugar A. Predictive factors for endothelial cell loss after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 80-3.
12. Liesegang TJ. The response of the corneal endothelium to intraocular surgery. *Refract Corneal Surg* 1991; 7: 81-6.
13. Mimouni F, Colin J, Koffi V, Bonnet P. Damage to the corneal endothelium from anterior chamber intraocular lenses in phakic myopic eyes. *Refract Corneal Surg* 1991; 7: 277-81.
14. Saragoussi JJ, Cotinat J, Renard G, Savoldelli M, Abenham A, Pouliquen Y. Damage to the corneal endothelium by minus power anterior chamber intraocular lenses. *Refract Corneal Surg* 1991; 7: 282-5.
15. Menezo JL, Cisneros AL, Rodríguez-Salvador V. Endotelial study of iris-claw phakic lens: two-year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24: 1039-49.
16. Kitzmann AS, Winter EJ, Nau CB, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Comparison of corneal endothelial cell images from a noncontact specular microscope and a scanning confocal microscope. *Cornea* 2005; 24: 980-4.
17. Olsen T. Non-contact specular microscopy of human corneal endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1979; 57: 986-98.
18. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing for agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1(8476): 307-10.
19. Benedetti S, Casamenti V, Marcaccio L, Brogioni C, Assetto V. Correction of myopia of 7 to 24 diopters with the artisan phakic intraocular lens: two-year follow-up. *J Refract Surg* 2005; 21: 116-26.
20. Leccisotti A, Fields SV. Clinical results of ZSAL-4 angle-supported phakic intraocular lenses in 190 myopic eyes. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31: 318-23.
21. Ravaiolo G, Botteri E, Baccara F. Long-term endothelial changes after implantation of anterior chamber intraocular lenses in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 1918-23.
22. Alió JL, Mulet ME, Shalaby AM. Artisan phakic iris claw intraocular lens for high primary and secondary hyperopia. *J Refract Surg* 2002; 18:697-707.
23. Allemann N, Chamon W, Tanaka HM, Mori ES, Campos M, Schor P, Baikoff G. Myopic angle-supported intraocular lenses. Two-year follow-up. *Ophthalmology* 2000; 107: 1549-54.
24. Pérez-Santónja JJ, Alió JL, Jiménez-Alfaro I, Zato MA. Surgical correction of severe myopia with an angle-supported phakic intraocular lens. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26: 1288-302.
25. Alió JL, De la Hoz F, Pérez-Santónja JJ, Ruiz-Moreno JM, Quesada JA. Phakic anterior chamber lenses for the correction of myopia: a 7-year cumulative analysis of complications in 263 eyes. *Ophthalmology* 1999; 106: 458-66.
26. Baikoff G, Arne JL, Bokobza Y, Colin J, George JL, Lagoutte F, Lesure P, Montard M, Saragoussi JJ, Secheyron P. Angle-fixated anterior chamber phakic intraocular lens for myopia of -7 to -19 diopters. *J Refract Surg* 1998; 14: 282-93.
27. Sugar A. Clinical specular microscopy. *Surv Ophthalmol* 1979; 24: 21-32.
28. De Sanctis U, Manchetta F, Razzano L, Dalmaso P, Grignolo FM. Corneal endothelium evaluation with 2 noncontact specular microscopes and their semiautomated methods of analysis. *Cornea* 2006; 25: 501-6.
29. Isager P, Hjortdal JO, Guo S, Ehlers N. Comparison of endothelium cell density estimated by contact and non-contact specular microscopy. *Acta Ophthalmol Scand* 2000; 78: 42-4.
30. Nichols JJ, Kosunick GM, Bullimore MA. Reliability of corneal thickness and endothelial cell density measures. *J Refract Surg* 2003; 19: 344-52.

dos de los modelos de microscopio especular existentes actualmente en el mercado: uno de contaje manual, Noncom Robo, y otro de contaje automático, CSO Specular Microscope. Hemos comprobado que ambos instrumentos resultan intercambiables para la medida de la densidad endotelial y del coeficiente de variación, pero no se aprecia ese hecho claramente para el porcentaje de hexagonalidad. El análisis de la hexagonalidad celular presenta una ligera menor variabilidad con el procedimiento automático.

Por lo tanto, el procedimiento automático del microscopio CSO resulta

equivalente al procedimiento manual del microscopio Noncom Robo para el análisis morfológico del endotelio corneal, sólo existiendo divergencias en el cálculo del porcentaje de hexagonalidad. ●

## Acerca de los autores

David P Piñero Llorens

Licenciado en Documentación

Vissum Instituto Oftalmológico de Alicante, España

Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía. Universidad de Alicante

Ana Belén Plaza Puche

Vissum Instituto Oftalmológico de Alicante, España