

## Microscopia especular con corrección manual vs. software automatizado

### Specular microscopy with manual correction vs. automated software

MSc. Arellys Ariocha Cambas Andreu,<sup>I</sup> MSc. Michel Guerra Almaguer,<sup>II</sup> MSc. Dra. Carmen de Prada Sánchez,<sup>I</sup> Dra. Odelaice Delgado Castillo,<sup>I</sup> Dr. Gonzalo García López de Trigo<sup>I</sup>

<sup>I</sup> Hospital Clínicoquirúrgico "Calixto García". La Habana, Cuba.

<sup>II</sup> Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer". La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

**Objetivo:** comparar los resultados del análisis del endotelio corneal, obtenidos mediante el software automatizado y la corrección manual.

**Métodos:** se realizó un estudio descriptivo, comparativo y longitudinal de la microscopia endotelial practicada a 20 adultos sanos (40 ojos). Fueron tomadas tres imágenes de cada ojo con el fin de seleccionar la de mejor calidad, para proceder posteriormente a la corrección manual del software en la pantalla del ordenador. La información de la base de datos fue procesada en el programa estadístico SPSS versión 19. Las variables cuantitativas se expresaron según sus respectivas medidas de resumen y se utilizó t Student para medir el grado de asociación entre las variables estudiadas (total de células identificadas, coeficiente de variabilidad, densidad celular e índice de hexagonalidad). Se trabajó con un nivel de confianza del 95 % y de error inferior al 0,05 %.

**Resultados:** al trazar los contornos celulares de forma manual, las medidas obtenidas respecto a la densidad celular, el índice de hexagonalidad y el coeficiente de variación coincidieron con lo obtenido en otros estudios. El primer parámetro analizado y comparado fue el número de células que son identificadas por el software, el cual reconoció los límites celulares por el cambio de coloración. La media osciló entre 106,8 para el ojo derecho, con un rango de 121/88 y 105,05 para el izquierdo, con un rango de 121/79; con una desviación estándar de 9,393. Por su parte, al realizar la corrección manual aumentó la media para todos los grupos de edades, de 113,5 en el ojo derecho (rango 151/80) y 112,1 en el ojo izquierdo, (rango de 147/88), con una desviación estándar de 13,657. Como puede apreciarse, se modificó significativamente la cantidad de células contabilizadas para ambos ojos, y pudo constatar que hubo células que no fueron identificadas y

otras que fueron interpretadas como dobles, errores que pueden ser corregidos manualmente y con esto se modifican los valores preestablecidos por el software.  
**Conclusiones:** la opción de trazar manualmente los límites celulares en la pantalla del ordenador para el análisis de los parámetros cuantitativos del endotelio corneal resulta efectiva durante la realización de la microscopia especular.

**Palabras clave:** microscopia especular, software, densidad, variabilidad celular, hexagonalidad.

---

## ABSTRACT

**Objective:** to compare the results of the corneal endothelium analysis through the automated software and its manual correction.

**Methods:** a longitudinal, comparative and descriptive study of the endothelial microscopy performed on 20 healthy adults (40 eyes). Three images from each eye were taken to select the best quality one in order to later make manual correction of the software on the computer screen. The information from the database was processed by the SPSS statistical program version 19. The quantitative variables were expressed as per their respective summary measures whereas Student's t test measured the level of association among the studied variables (total number of identified cells, variability coefficient, cell density and hexagonality index). The 95% confidence interval and the error below 0,05 % were used.

**Results:** the manual drawing of cell contours yielded cell density, hexagonality index and variation coefficient values similar to those of other studies. The first analyzed and compared index was the number of cells that the software identified by recognizing the cell limits based on color changes. The mean ranged from 106,8 for the right eye with a range of 121/88 to 105,05 for the left eye with a range of 121/79, being the standard deviation of 9,393. On the other hand, the manual correction increased the mean for all the age groups to 113,5 for the right eye (range 151/80) and 112,1 for the left eye (range of 147/88), being the standard deviation of 13,657. As it may be observed, the number of cells for both eyes significantly changed and there were cells which were either unidentified or taken as doubles; these are errors that may be manually corrected, thus changing the set values of the software.

**Conclusions:** the choice of manually drawing the cell limits on the screen for the analysis of the quantitative parameters of the corneal endothelium proves to be effective during the specular microscopy.

**Key words:** specular microscopy, software, density, cell variability, hexagonality.

---

## INTRODUCCIÓN

La visualización del endotelio corneal es posible desde que *Vogt* en 1921 describió la biomicroscopia especular.<sup>1</sup> A finales de los años sesenta, *Maurice* introdujo el microscopio especular y se han desarrollado numerosas variantes con el fin de perfeccionar este estudio. Esta técnica se basa en la reflexión de la luz en la interfase endotelio-humor acuoso y permite la observación del endotelio corneal a

---

gran aumento. El hecho de que la distribución celular es prácticamente uniforme permite que cuando estudiamos un área de dimensiones determinadas podamos conocer el número, la forma y el tamaño de la población endotelial total.<sup>2</sup>

El primer sistema de análisis del endotelio corneal asistido por ordenador fue desarrollado por *Laing* y otros en 1979. Los modernos métodos de análisis de imagen asistidos por ordenador permiten un estudio morfológico y morfométrico del endotelio más completo.<sup>3,4</sup> La principal función metabólica del endotelio corneal es el mantenimiento de la adecuada hidratación estromal, imprescindible para lograr la transparencia corneal; para cumplir esta misión, el endotelio dispone de una monocapa de 1 600 a 4 000 células/mm<sup>2</sup>. Por existir gran reserva funcional del endotelio, la descompensación metabólica solo se produce cuando la pérdida celular es extrema.<sup>5,6</sup>

El microscopio especular de no contacto Topcon SP 3000 permite obtener fotografías del endotelio corneal y está diseñado para acoplarse a un sistema digitalizador de imágenes que permitirá la posterior visualización de la imagen obtenida en la pantalla de un ordenador. Para eso es necesaria la instalación de un software (IMAGEnet) que permite realizar de forma automatizada el estudio cuantitativo y morfométrico de una fotografía endotelial y además ofrece la alternativa de trazar y corregir manualmente los límites celulares en la pantalla del ordenador. Es necesario obtener imágenes fotográficas nítidas, excluir en el recuento las zonas de guttas, desechar aquellas células de los extremos cuyo contorno no aparezca en su totalidad y ser muy exhaustivo en la modificación celular manual. Con los contornos celulares definitivos, el ordenador analizará nuevamente y nos informará los resultados de los parámetros ya modificados: el número total de células en la zona, la superficie de la célula mayor y la menor, la media de todas las superficies, la desviación estándar (SD) de las superficies, el coeficiente de variabilidad celular (CV), la hexagonalidad y la densidad celular.<sup>7</sup>

En este trabajo realizamos microscopia especular de no contacto a adultos sanos, comparando los resultados obtenidos de manera automática con el software y su corrección manual realizada posteriormente, con el propósito de determinar si es efectiva la aplicación de la corrección manual en aras de personalizar este método diagnóstico y ampliar el campo de utilidades cuando se trate de evaluar cuantitativamente el mosaico endotelial.

Esta investigación se realizó con el objetivo de comparar los valores cuantitativos del software automatizado de la microscopia especular, con la aplicación del sistema de corrección manual.

## MÉTODOS

Realizamos un estudio descriptivo, comparativo y longitudinal de las microscopias especulares realizadas a 20 pacientes (40 ojos), de adultos sanos, a quienes les tomamos 3 imágenes de cada ojo con el fin de seleccionar la de mejor calidad, para posteriormente proceder a la corrección manual del software en la pantalla del ordenador.

Incluimos en el estudio a adultos sanos entre 20 y 50 años, con agudeza visual con o sin corrección de la unidad y examen oftalmológico normal, y excluimos pacientes con antecedentes patológicos personales de diabetes mellitus, uveítis, glaucoma o hipertensión ocular y uso de lentes de contacto.

El recuento endotelial se realizó con un microscopio especular de no contacto (SP 3000 P), el cual fue conectado a un sistema digitalizador de imágenes que, al captarlas, se visualizaban en la pantalla del ordenador. Almacenamos las imágenes de ambos ojos y seleccionamos de cada uno la mejor, para realizar inicialmente el análisis de los parámetros del recuento endotelial con el software (programa que realiza una asignación de los contornos celulares de manera automática) y posteriormente a esa misma imagen le realizamos la corrección manual, auxiliándonos de las opciones que proporciona el propio software, e incorporamos los valores obtenidos en nuestra base de datos para posteriormente comparar las modificaciones cuantitativas entre el software y el sistema de corrección manual. La información de la base de datos fue procesada en el programa estadístico SPSS versión 19. Para el análisis de las variables cuantitativas se aplicaron estadísticas descriptivas, máximo, mínimo, media, desviación estándar, y se utilizó t Student para muestras relacionadas (total de células identificadas, coeficiente variabilidad, densidad celular e índice de hexagonalidad). Se trabajó con un nivel de confianza del 95 % y de error inferior al 0,05 %.

## RESULTADOS

Cuando trazamos los contornos celulares de forma manual, las medias obtenidas respecto a la densidad celular, el índice de hexagonalidad y el coeficiente de variación coincidieron con las obtenidas en otros estudios como normales. El primer parámetro analizado y comparado fue el número de células que son identificadas por el software, el cual reconoce los límites celulares por el cambio de coloración. La media osciló entre 106,8 para el ojo derecho (OD), con un rango de 121/88, y 105,05 para el izquierdo (OI), con un rango de 121/79 y una desviación estándar (DE) de 9,393. Por su parte, al realizar la corrección manual aumentó la media para todos los grupos de edades de 113,5 OD (rango 151/80) y 112,1 OI (rango de 147/88), con una DE de 13,657. Como puede apreciarse, se modificó significativamente la cantidad de células contabilizadas para ambos ojos, y pudo constatar que hubo células que no fueron identificadas y otras que fueron interpretadas como dobles, errores que pudieron ser corregidos manualmente y con esto se modificaron los valores prestablecidos por el software (tabla 1).

**Tabla 1.** Total de células identificadas. Software automatizado/ corrección manual

Número de Células						
-	Automatizado			Manual		
	Mayor	Menor	Media	Mayor	Menor	Media
OD	121	88	106,8	151	80	113,5
OI	121	79	105,05	147	88	112,1
<i>p</i>	0,000					

Dos parámetros de suma importancia en el estudio del endotelio corneal son el cambio de tamaño y la forma celular, reflejados por el coeficiente de variación celular y el porcentaje de hexagonalidad, respectivamente, donde se relacionan los cambios en el tamaño y la morfología celular con una mayor pérdida endotelial posquirúrgica y una mayor incidencia de descompensaciones corneales.<sup>8,9</sup>

El coeficiente de variabilidad celular (polimegetismo) sirve para expresar las diferencias en el tamaño de las células individuales. Es un número menor que 1, que procede de dividir la desviación estándar de un área celular entre la media de dicha área. El coeficiente normal de variación en el tamaño celular oscila entre 25-33 %.<sup>8,9</sup>

Al analizar esta variable encontramos que con la aplicación del software automatizado el rango de los valores para el OD fue de 99,1/32, con una media de 45,06 % en el OI. Estas cifras oscilaron entre 99,3/34,2 con una media de 51,28 % y una DE de 20,1793. Una vez realizada la corrección manual del software, los valores medios de esta variable se redujeron de manera significativa para ambos ojos a 36 %, con una DE de 10,3478 (tabla 2).

**Tabla 2.** Coeficiente de variabilidad celular. Software automatizado/corrección manual

Coeficiente de variabilidad celular (%)						
	Automatizada			Manual		
	Mayor	Menor	Media	Mayor	Menor	Media
OD	99,1	32	45,06	46,4	29,7	36
OI	99,3	34,2	51,28	74,9	26,5	36
<i>p</i>	0,001					

La densidad celular puede ser calculada contando las células incluidas en un área rectangular de dimensiones conocidas, y los valores promedios aceptados son: 2 000 o más cél/mm<sup>2</sup> (normal); 1 500-2 000 cél/mm<sup>2</sup> (bajo riesgo quirúrgico); 1 000-1 500 cél/mm<sup>2</sup> (alto riesgo quirúrgico); 600-1 000 cél/mm<sup>2</sup> (pre-edema) y menos de 600 cél/mm<sup>2</sup> (edema corneal). Este es un parámetro que se mantuvo dentro de límites normales (tabla 3), con una media para el OD de 2 684,5, y al aplicar la corrección manual de ese ojo los valores medios obtenidos fueron de 2 729,1 con un rango de 3 551/2 019. En cuanto al OI, con la aplicación del software la media fue de 2 687,4 y con la manual de 2 741,1 (rango de 3 389/2 175), con una DE de 291,455 para la aplicación automatizada del software y una DE de 190,544 cuando se aplicó la corrección manual.

**Tabla 3.** Densidad celular. Software automatizado/corrección manual

Densidad celular (cél/mm <sup>2</sup> )						
-	Automatizada			Manual		
	Mayor	Menor	Media	Mayor	Menor	Media
OD	3 071	2 312	2 684,5	3 551	2 019	2 729,1
OI	3 009	2 221	2 687,45	3 389	2 175	2 741,1
<i>p</i>	0,000	-	-	-	-	-

El índice de hexagonalidad (pleomorfismo) está basado en las formas celulares, donde en el endotelio corneal normal más del 60 % de las células deben mantener la forma hexagonal.<sup>8,9</sup> Este parámetro, representado en la tabla 4, mostró valores bajos, con la aplicación inicial del software; luego de ser corregidos manualmente de 47,55 % (rango de 75/29) para el OD aumentó a 58,3 % la media de dicha variable (rango de 79/45), y para el OI de 45,05 % (rango de 67/26) a 57 % (rango de 72/46) valores que fueron estadísticamente significativos con un valor de  $p < 0,001$  y con una DE de 12,740 para el software automatizado y una DE de 7,924 para la corrección manual.

**Tabla 4.** Índice de hexagonalidad. Software automatizado/corrección manual

Índice de hexagonalidad (%)						
-	Automatizada			Manual		
	Mayor	Menor	Media	Mayor	Menor	Media
OD	75	29	47,55	79	45	58,3
OI	67	26	45,05	72	46	57
<i>p</i>	0,001					

Cuando se analizaron las cuatro variables juntas, el resultado del *test* ANOVA también arrojó un nivel de significación menor de 0,01, lo cual nos permitió afirmar que la evaluación del endotelio corneal resultó más eficaz cuando delineamos las formas celulares manualmente, lo que resultó ser una alternativa efectiva, fiable y segura, aunque requirió mayor inversión de tiempo al evaluar y personalizar cuantitativamente los parámetros morfométricos del endotelio corneal.

## DISCUSIÓN

La microscopia especular es una técnica que nos permite obtener imágenes con gran amplificación de las células endoteliales. Proporciona una visión clara de las células vivas sin alterar su función ni su morfología. Con este examen se puede realizar un recuento endotelial por área de superficie y determinar si existe una alteración en la forma o tamaño de las células endoteliales. Estos parámetros dan un marco de la capacidad funcional del endotelio corneal. Es una prueba diagnóstica de gran utilidad clínica, y es la modalidad semiológica más objetiva para evaluar clínicamente el endotelio corneal, especialmente para casos operados que requieran una segunda intervención intraocular, o cuando se sospecha de una alteración endotelial primaria.<sup>10-17</sup>

Este estudio se basa en la reflexión de un haz luminoso incidente sobre el endotelio de la córnea. Parte de este rayo incidente se refleja de forma especular y es captado por el microscopio especular, que presenta una imagen endotelial magnificada. Numerosos estudios han sugerido que las alteraciones en la forma y el tamaño celular indican una inestabilidad o una menor reserva funcional del endotelio corneal, o que pueden ser un signo temprano de pérdida celular endotelial continuada.<sup>8</sup> Cuanto más bajo es el conteo de células endoteliales, mayor es la

variación del tamaño celular; y cuanto más marcada es la variación en la forma de las células, menos sano será el endotelio corneal.<sup>9-11</sup> Se estima que el límite mínimo de células endoteliales para mantener la transparencia corneal se encuentra entre 500 a 700 cél/mm<sup>2</sup>.<sup>9-11</sup> Las células endoteliales en el humano no se multiplican, y existe una pérdida a través de la vida que ha sido calculada en alrededor del 0,6 % anual.<sup>18</sup>

Una córnea transparente con paquimetría normal no garantiza que se tenga un endotelio sano. La densidad de células endoteliales (ECD), en la cual ocurre el edema corneal, es variable y se estima que está alrededor de 300 a 700 cél/mm<sup>2</sup>. Un estudio reciente reportó que al menos el 14 % de injertos transparentes en queratoplastias penetrantes (40 de 277 pacientes) en un lapso de 5 años tenían un recuento endotelial menor de 500 cél/mm<sup>2</sup>. En cirugía de trabeculectomía se ha observado un descenso significativo en el EDC (7-54,8 % a los 3 meses) o implantes de dispositivos de drenaje para tratar el glaucoma (10,5-15,3 % al año de la cirugía); sin embargo, esta pérdida endotelial es mucho menor en los pacientes intervenidos de esclerotomía profunda no perforante (2,6 % a los 3 meses). Los factores de riesgo asociados a una mayor pérdida endotelial son: menor profundidad de cámara anterior en el posoperatorio precoz, el contacto iridocorneal y, sobre todo, corneolenticular.<sup>19</sup>

En casos de cirugía combinada de catarata y glaucoma, la pérdida de células endoteliales es similar entre la trabeculectomía y la esclerotomía profunda no perforante, ya que la pérdida posterior a la facoemulsificación es mayor. Los resultados están relacionados con los diferentes tipos de cirugía filtrante (Fig. 1 y 2).<sup>20</sup> La opción de trazar manualmente los límites celulares en la pantalla del ordenador para el análisis de los parámetros cuantitativos del endotelio corneal resulta ser una alternativa efectiva, fiable y segura durante la realización de la microscopía especular.

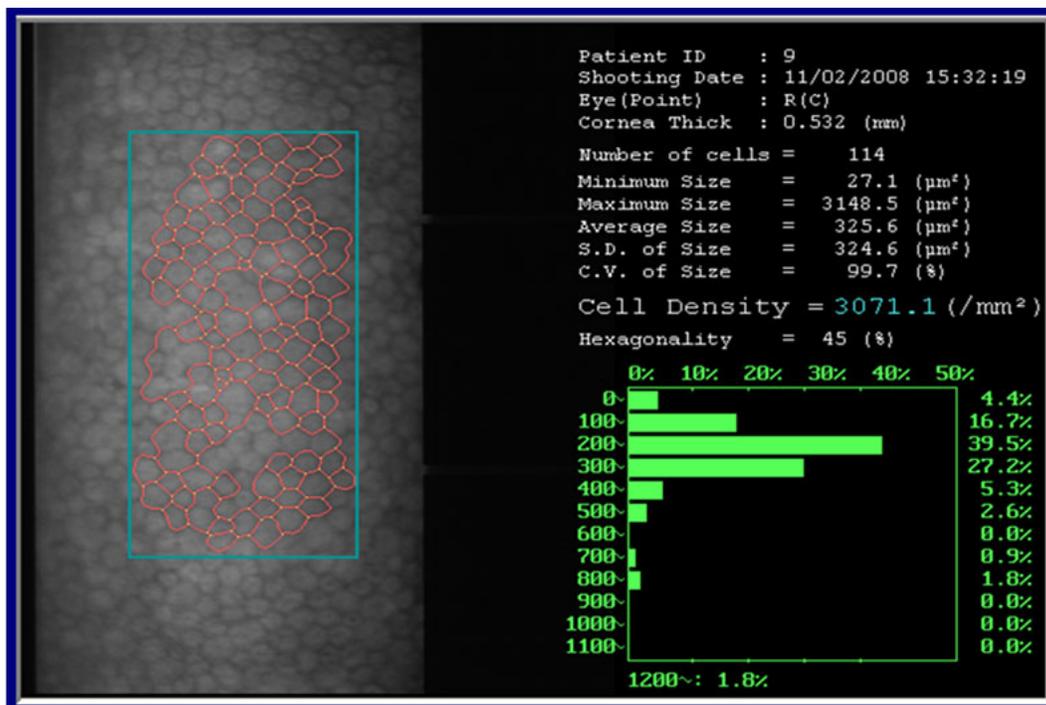


Fig. 1. Software automatizado.

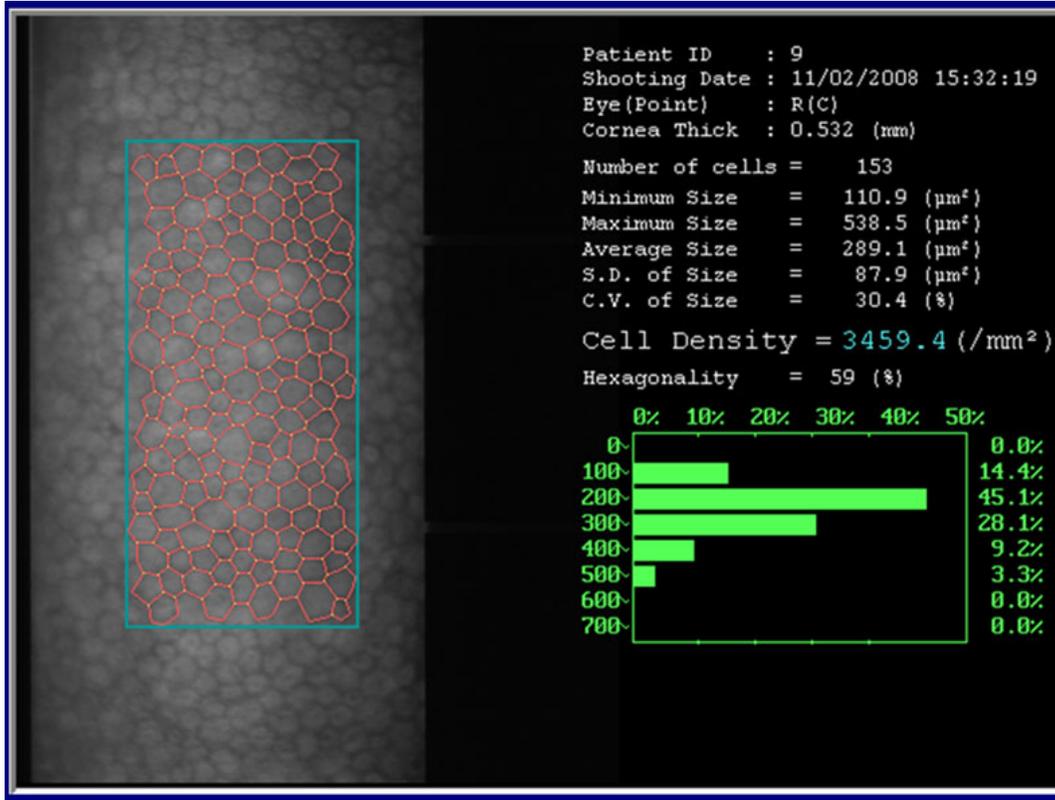


Fig. 2. Corrección manual.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vogt A. Die Sichtbarkeit des lebenden Hornhautendothels im Lichtbündel der gullstrandschen Spaltlampe. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1919;63:233-4.
2. Maurice DM. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia.* 1968;24:1094.
3. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Arch Ophthalmol.* 1975;93:143.
4. Laing R, Sandstrom M, Leibowitz H. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. *Arch Ophthalmol.* 1979;97:1714-9.
5. Orts P, Calatayud M, Rodrigo F, Belmonte J. Biomicroscopia especular en córneas donantes antes de la queratoplastia y tras un año de seguimiento. *Microcir Ocul.* 2004;12(1):5-8.
6. Pérez Torregrosa DV, Cisneros A, Harto M, Maldonado M, Cervera M, Menezo JL, et al. Método de análisis endotelial mediante microscopia especular de no-contacto y sistema de análisis por la imagen en una serie de voluntarios sanos. *Ann*

Oftalmol. 1995 [citado 12 de junio de 2014];5(3). Disponible en:  
[http://www.nexusediciones.com/np\\_ao\\_1995\\_5\\_3\\_003.htm](http://www.nexusediciones.com/np_ao_1995_5_3_003.htm)

7. Díaz Couchoud P, Duch Bordás F, Martínez Camps E, Carceller A, Bruix A, Doñate T, de la Cámara J. Estudio de la patología corneal en pacientes con insuficiencia renal crónica en programa de hemodiálisis. *Ann Oftalmol.* 1997 [citado 12 de junio de 2014];7(4). Disponible en: <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=337002>

8. Schultz RO, Glasser DB, Matsuda M. Response of the corneal endothelium to cataract surgery. *Arch Ophthalmol.* 1986;104:1164-9.

9. Krachmer J. *Microscopia especular. Los requisitos en Oftalmología.* Madrid: Mosby; 2000.

10. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *Am J Ophthalmol.* 1982;93:1-35.

11. Shaw EL, Rao GN, Arthur EJ, Aquavella JV. The function reserve of corneal endothelium. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1978;85:640-5.

12. Boume WM, Kaufman HE. Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. *Am J Ophthalmol.* 1976;81(3)15:319-23.

13. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985;4:671-8.

14. Williams KK, Noe RL, Grossniklaus HE, Drews-Botchs C, Edelhauser HF. Correlation of histologic corneal endothelial cell counts with specular microscopic cell density. *Arch Ophthalmol.* 1992;110(8):1146-9.

15. Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmol.* 1982;89(6):531-90.

16. Matsuda M, Suda T, Manabe R. Serial alterations in endothelial cell shape and pattern intraocular surgery. *Am J Ophthalmol.* 1984;98(3):313-9.

17. Mac Rae SM, Matsuda M, Phillips DS. The long-term effects of polymethylmethacrylate contact lens wear on the corneal endothelium. *Ophthalmol.* 1994;101(2):365-70.

18. Nasser-Hashemian M, Moghiami S, Aghsaide Fard M. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Iranian eyes. *BMC Ophthalmol.* 2006;6:9.

19. Elis D, Aristizábal D, Gris O, Guell J, Arrondo E. Estudio endotelial con microscopia especular. En: Lorente R. *Catarata & Glaucoma.* Madrid: Secoir; 2012. p. 92-5.

20. Arnavielle S, Lafontaine PO, Bidot S. Corneal endothelial cell changes after trabeculectomy and deep sclerotomy. *J Glauc.* 2007;16:324-8.

Recibido: 15 de abril de 2014.  
Aprobado: 25 de mayo de 2014.

MSc. Arellys Ariocho Cambas Andreu. Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer". Ave. 76 No. 3104 entre 31 y 41 Marianao, La Habana, Cuba. Correo electrónico: ariocho@infomed.sld.cu