

Reproducibilidad de la microscopía especular de no contacto de acuerdo con el número de células evaluadas

**Dra. María Elisa Pizarro-Barrera, Dr. Manuel A. Garza-León, Dr. Francisco Beltrán-Díaz de la Vega,
Dr. Ramón Naranjo-Tackman**

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la densidad endotelial corneal según el número de células analizadas y encontrar el número de células analizadas más constante.

Métodos: Estudio prospectivo, transversal y observacional donde se realizaron microscopías especulares de no contacto contando 20, 30, 40, 50 y 70 células. Se analizaron los datos para encontrar el número de células más cercano al promedio y la variabilidad de los resultados.

Resultados: Se evaluaron 30 microscopias especulares del ojo derecho de voluntarios sanos, 66% del sexo masculino, con una edad promedio de 28.3 ± 13.72 años (rango de 17 a 84). El promedio de células endoteliales del grupo de 20 células fue 2541.66 ± 451.64 células/mm², de 30 células 2552.70 ± 431.12 , de 40 células 2539.53 ± 417.36 , de 50 células 2542.16 ± 397.46 y de 70 células 2569.60 ± 361.72 y el promedio general fue de 2549.26 ± 407.29 . No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Conclusiones: En este grupo de pacientes sanos, existe una alta reproducibilidad en todos los conteos de células endoteliales y no existe diferencia entre el número de células estudiadas.

Palabras clave: Microscopía especular, densidad endotelial, reproducibilidad.

SUMMARY

Objective: To evaluate the corneal endothelium density according to the number of evaluated cells and to find the most constant number of cells.

Methods: Prospective transverse and observational study. Non-contact specular microscopies were realized, counting 20, 30, 40, 50 and 70 cells. The data were analyzed to find the number of cells closer to the average and the variability of the results.

Results: Thirty specular microscopies were evaluated, from healthy volunteers. 66% male, with an average age of 28.3 ± 13.72 (range of 17-84). The average of endothelial cells in the group of 20 cells was 2541.66 ± 451.64 cells/mm², in the 30 cells group was 2552.70 ± 431.12 , in the 40 cells group was 2539.53 ± 417.36 , in the 50 cells group was 2542.16 ± 397.46 and in the 70 cells group it was 2569.60 ± 361.72 . The general average was 2549.26 ± 407.29 . There was no significant statistical difference between the groups.

Conclusions: In this group of healthy patients, there's a high reproducibility in all endothelial cell counts and there's no difference between the number of cells studied.

Key words: Specular microscopy, endothelial cell density, reproducibility

INTRODUCCIÓN

La función principal del globo ocular es la transmisión de las imágenes que nos rodean y para esto son necesarias varias características: la integridad del globo ocular, la función adecuada de las células retinianas y la transparencia de los medios de refracción.

La córnea debe su transparencia a varios factores: la ausencia de vasos sanguíneos, la disposición espacial de las

lamelas de colágena, así como la concentración exacta de hidratación (70%) dentro del estroma corneal, siendo el endotelio el principal encargado de esta función (1-3).

El endotelio es una monocapa de células hexagonales que se encuentran unidas fuertemente en su región apical para evitar el paso de líquidos a través de ellas, además cuenta con una bomba de sodio/potasio que regula la cantidad de agua que pasa a través de él (3).

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 (4).

La cuantificación de la densidad endotelial es muy importante en la práctica clínica para fines diagnósticos así como para la planeación de procedimientos quirúrgicos intraoculares o corneales y la evaluación de la seguridad corneal de los mismos (5-7).

La microscopía especular es la técnica más frecuentemente utilizada para la valoración de la densidad endotelial. Inicialmente se realizaba mediante la microscopía especular de contacto, pero los avances tecnológicos hicieron posible que se realizara mediante una técnica de no contacto que tiene como ventajas disminuir las alteraciones de la superficie, la posibilidad de transmisión de infecciones y la mayor facilidad para su realización (8).

El microscopio especular Topcon SP-2000P (Topcon Corp. Tokio, Japón) es un microscopio especular de no contacto, que presenta la ventaja de contar con un foco automático además de un programa externo de manejo de las imágenes muy versátil (IMAGEnet 2000).

Los parámetros que pueden calcularse a través de la microscopía especular son: densidad endotelial, coeficiente de variación o polimegatismo y porcentaje de hexagonalidad o pleomorfismo.

Hasta el momento no existen estudios que evalúen el número necesario de células a analizar para la estimación correcta de la densidad endotelial cuando no se utilizan programas de manejo de imágenes externos al microscopio especular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, transversal y observacional en el que se incluyeron 30 voluntarios sanos quienes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio. Los criterios de exclusión fueron: antecedente de cirugía ocular, uso de lente de contacto, enfermedades sistémicas como diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica y otras que pudieran afectar la densidad endotelial, cualquier enfermedad ocular como glaucoma o uveítis, y corneal como distrofia endotelial de Fuchs.

A todos los pacientes se les realizó una microscopía especular de no contacto con el microscopio Topcon SP-2000P sólo en el ojo derecho por un mismo observador.

Para la realización de la microscopía especular se tomaron en cuenta sólo las imágenes captadas con el foco automático. Posterior a la captura de la imagen se realizó una técnica simplificada de análisis celular incluida en el microscopio TOPCON SP-2000P llamada técnica del punto o centro (9, 10).

Esta técnica consiste en la identificación del centro de diez o más células continuas en una imagen endotelial mediante la aplicación de un punto con el ratón. El programa del SP-2000P mide las distancias entre los centros de cada célula previamente marcada y con esto realiza un cálculo del área promedio de las células endoteliales y por tanto de la densidad endotelial.

Para la cuantificación de la densidad endotelial se identificaron 20 células endoteliales obteniéndose el resultado calculado por el programa; posteriormente, utilizando la misma imagen, se identificaron 30 células endoteliales y se obtuvieron los resultados, este mismo procedimiento se realizó con la única variante del número de células identificadas que fue de 40, 50 y 70 células.

El programa del microscopio especular Topcon SP-2000P calcula de manera automática y muestra en sus resultados las siguientes variables: densidad endotelial promedio (medida en células/mm²), área celular promedio (micras²) y coeficiente de variación del tamaño celular (este se calcula mediante la división de la desviación estándar y el área celular promedio) el cual fue tomado como índice de la extensión en la variación del área celular o polimegatismo.

Ya obtenidos todos los resultados, se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t de Student para comparar resultados entre dos grupos y ANOVA para la evaluación de todos los grupos, con el fin de obtener la variabilidad en la densidad endotelial.

Resultados

Se evaluaron 30 microscopías especulares de voluntarios sanos, 66% del sexo masculino, con una edad promedio de 28.3 ± 13.72 años (rango de 17 a 84).

El promedio de células endoteliales del grupo de 20 células fue 2541.66 ± 451.64 células/mm², de 30 células 2552.70 ± 431.12 , de 40 células 2539.53 ± 417.36 , de 50 células 2542.16 ± 397.46 y de 70 células 2569.60 ± 361.72 y el promedio general fue de 2549.26 ± 407.29 (cuadro 1).

Cuadro 1. Características de las células endoteliales de acuerdo al número de células evaluadas

Células evaluadas	Densidad endotelial promedio	Área celular promedio	Polimegatismo promedio
20	2541.66	405.86	46.63
30	2552.70	410.73	58.13
40	2539.53	406.40	59.76
50	2542.16	403.33	55.60
70	2569.60	397.00	62.06
General	2549.26	404.66	56.43

Cuadro 2. Concordancia de acuerdo con el número de células estudiadas

Número de células	DE Promedio	Porcentaje de concordancia
20	2541.66	99.70
30	2552.70	100.13
40	2539.53	99.61
50	2542.16	99.72
70	2569.60	100.79
General	26549.26	1000.00

DE= desviación estándar.

Al considerar el promedio general como el estándar de oro (o valor más cercano a la realidad), la concordancia de los diferentes grupos con el promedio general (expresados en porcentaje), la variabilidad en todos los grupos fue menor a 1% (cuadro 2).

La distribución estimada de la densidad endotelial en relación con edad de los pacientes se presenta en la gráfica 1. Debido al número de participantes y su distribución por grupos de edades no es posible realizar un análisis adecuado de el impacto que tiene la edad en la densidad endotelial, sin embargo, 80% de los pacientes están en el rango de edad entre 15 y 30 años y en este grupo la densidad endotelial promedio es de 2595.88 ± 286.52 .

Al evaluar la área celular, los valores promedio encontrados en general fueron de 404.66 ± 77.05 , en el grupo de 20 células estudiadas fue de 405.86 ± 79.19 en 30 células fue de 410.73 ± 85.23 , en 40 células fue 406.4 ± 88.07 , en las 50 células fue de 403.33 ± 71.49 y al evaluar 70 células se encontró un promedio de 397 ± 61.25 (cuadro 1).

En relación con el polimegatismo, los valores promedio encontrados en general fueron de 56.43 ± 18.0 , en el grupo de 20 células estudiadas el coeficiente de variación fue de 46.63 ± 14.17 (rango 27 a 85), en 30 células fue de 58.13 ± 26.17 (rango 32 a 137), en 40 células fue 59.76 ± 20.86 (rango

35 a 118), en las 50 células fue de 55.60 ± 14.35 (rango de 39 a 89) y al evaluar 70 células se encontró un promedio de 62.06 ± 14.46 (rango de 38 a 96) (cuadro 1).

Cuando estudiamos los valores promedio encontrados por paciente y la edad, no se encontró una relación estadísticamente significativa (gráfica 2).

El análisis mediante la prueba t de Student entre los promedios del grupo de 20 y 30 células mostró una p de 0.203, entre los grupos de 30 y 40 células una p de 0.337, entre los grupos de 40 y 50 células la p fue de 0.93, finalmente entre el grupo de 50 células y 70, la p fue de 0.869.

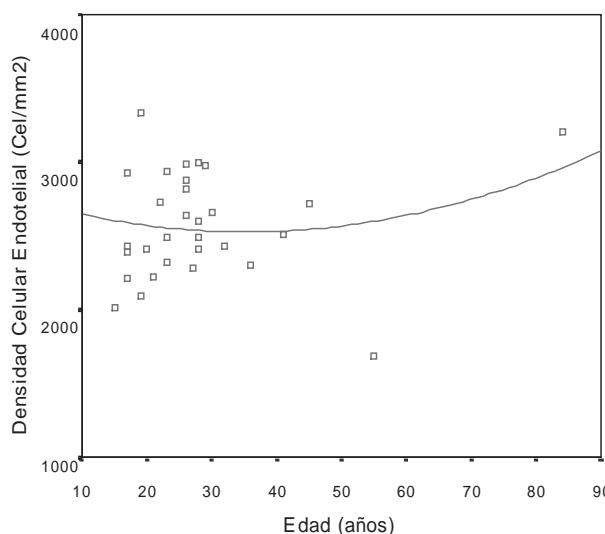
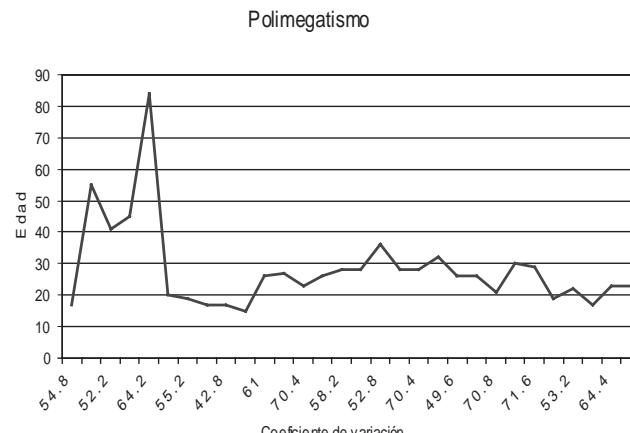
La prueba de ANOVA para encontrar la diferencia entre todos los grupos no mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.889$) entre los promedios de los 5 grupos (20, 30, 40, 50 y 70 células analizadas). Eso se puede ver también en la gráfica 3 en donde se aprecia que los promedios de los cinco grupos son muy similares y los intervalos de confianza (IC 95%) también son muy similares.

DISCUSIÓN

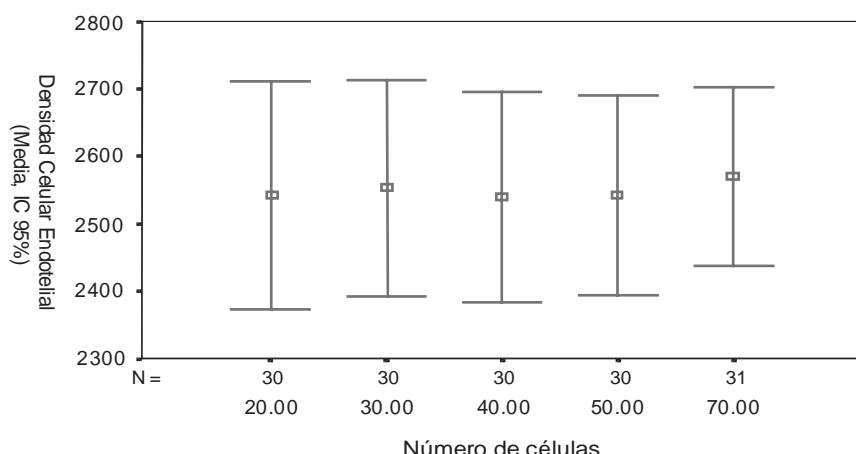
El análisis de las células endoteliales es una fuente muy importante para evaluar la función y viabilidad corneal. La determinación de la densidad corneal es un parámetro ampliamente utilizado y de gran ayuda para la evaluación clínica y diagnóstica de padecimientos corneales así como el impacto que los procedimientos quirúrgicos oculares tienen en la función corneal (5-7).

La densidad endotelial general encontrada en nuestro estudio (2549.26 ± 407.29 células/mm²) está dentro de los rangos encontrados en otros estudios, aunque se reportan diferencias étnicas (11, 12).

Al comparar la densidad promedio de los pacientes entre 15 y 30 años de nuestro hospital (24 pacientes) encontramos que la densidad endotelial en pacientes mexicanos (de 2595.88 ± 286.52) es menor a la reportada en otros grupos étnicos, siendo esta diferencia más importante en relación con los pacientes de origen japonés. Los reportes de densi-

Gráfica 1. Densidad endotelial estimada de acuerdo con la edad de los pacientes**Gráfica 2. Relación entre el coeficiente de variación (polimegatismo) y la edad**

Gráfica 3. Promedio e intervalo de confianza de los cinco grupos estudiados.



dad endotelial en poblaciones americanas en pacientes entre 20 y 30 años es de 2977 ± 324 (12), en filipinos 2949 ± 270 (13), en indios es 2782 ± 250 (14) y en japoneses de 3893 ± 259 (12).

Al evaluar los resultados encontrados en cada grupo de células analizadas (20, 30, 40, 50 y 70 células) no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los grupos ($p = -.203, .337, -0.93, -.869$). Esto contrasta con lo reportado por Doughty y col. (15) que encontraron que existía una variación de $\pm 20\%$ al tomar 5 células, $\pm 17\%$ por 10 células, $\pm 9.5\%$ por 25 células y es hasta cuando se analizan 70 células que la variabilidad llega a 2% que se considera clínicamente insignificante. Sin embargo, estos autores utilizan un microscopio especular Topcon SP-1000 así como otro método de imagen para el cálculo de la densidad endotelial (Bioquant IV; R & M Biometrics, Nashville TN, USA) y diferentes imágenes de microscopía especular (varianza intra sujetos)

Es de llamar la atención el alto valor del coeficiente de variación (polimegatismo) encontrado en nuestro estudio (56.43 ± 18.0), que contrasta con lo encontrado por Nasser y col. (4) al estudiar a un grupo de voluntarios sanos iraníes en que fue de 24.1 ± 7.1 .

Aunque el grupo estudiado es pequeño y no existe una distribución adecuada de los participantes por grupo de edad, no se pudo observar una correlación entre el polimegatismo y la edad o el polimegatismo y la densidad endotelial.

CONCLUSIONES

En este grupo de pacientes sanos, existe una alta reproducibilidad en todos los conteos de células endoteliales y no existe diferencia entre numero de células estudiadas.

REFERENCIAS

1. Stocker FW. The endothelium of the cornea and its clinical implications. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1953; 51:669-78.
2. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *Ophthalmology* 1982; 89:525-30.
3. Waring GO 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium: normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982; 89:531-90.
4. Nasser-Hashemian M, Moghiami S, Aghsaei Fard M y cols. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Iranian eyes. *BMC Ophthalmology* 2006; 6:9-14.
5. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Continued endothelial cell loss ten years after lens implantation. *Ophthalmology* 1994, 101:1014-22.
6. Walkow T, Anders N, Klebe S. Endothelial cell loss after phacoemulsification: relation to preoperative and intraoperative parameters. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26:727-32.
7. Pop M, Payette Y. Initial results of endothelial cell counts after Artisan lens for phakic eyes. *Ophthalmology* 2004; 111:309-17.
8. Landez M, Siertsema JV, Van Rij G. Comparative study of three semiautomated specular microscopes. *J Cataract Refract Surg* 1995; 21:409-16.
9. Ohno K, Nelson LR, McLaren JW y cols. Comparison of recording systems and analysis methods in specular microscopy. *Cornea* 1999; 18:416-423.
10. Benetz BA, Diaconu E, Bowlin SJ y cols. Comparison of corneal endothelial image analysis by Konan SP8000 noncontact and Bio-Optics Bambi Systems. *Cornea* 1999; 18:67-72.
11. Snellingen T, Rao GN, Shrestha JK y cols. Quantitative and morphological characteristics of the human corneal endothelium in relation to age, gender, and ethnicity in cataract populations of South Asia. *Cornea* 2001; 20:55-58.
12. Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Comparison of the corneal endothelium in an American and a Japanese population. *Arch Ophthalmol* 1985; 103:68-70.
13. Padilla MD, Sibayan SA, Gonzales CS. Corneal Endothelial Cell Density and Morphology in Normal Filipino Eyes. *Cornea* 2004; 23(2):129-135.
14. Rao SK, Sen PR, Fogla R y cols. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Indian eyes. *Cornea* 2000; 19:820-823.
15. Doughty MJ, Müller A, Zaman MI. Assessment of the Reliability of Human Corneal Endothelial Cell-Density Estimates Using a Noncontact Specular Microscope. *Cornea* 2000; 19(2):148-58.