

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FUNDACIÓN HOSPITAL “NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ”
DEPARTAMENTO DE CÓRNEA

**“EVALUACIÓN DEL ENDOTELIO CORNEAL CON MICROSCOPIA
CONFOCAL Y ESPECULAR”**

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
CIRUJANO OFTALMÓLOGO

P R E S E N T A:
DRA. MYRNA RODRÍGUEZ LÓPEZ

ASESORES: DRA. REGINA VELASCO RAMOS
DR. OSCAR BACA LOZADA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mis padres En especial a mi Madre por quien siento una profunda admiración, porque su tenacidad, fuerza, coraje y gran deseo por ser mejor cada día ha sido mi guía y me ha acompañado en este largo camino.

A mis hermanos En especial a Silvia quien ha estado toda mi vida junto a mí y ha compartido los momentos más importantes conmigo.

A mi familia A mi abuela, Delia y Silvia por el apoyo y el cariño que me han brindado.

Agradecer inmensamente a la vida que me ha dado la oportunidad de cumplir todos mis objetivos y de llegar a esta etapa después de una larga travesía.

Al Hospital en el cual he pasado tres años de mi vida, muchas horas de trabajo, estudio, dedicación y momentos difíciles que me han servido para crecer como ser humano y médico.

A todos los maestros que en algún momento lograron transmitir conocimientos y habilidades para mi desempeño profesional.

A todos mis compañeros y amigos.

ÍNDICE

Introducción.....	4
Justificación.....	10
Hipótesis.....	11
Objetivo.....	12
Material y Métodos.....	13
Resultados.....	15
Discusión.....	23
Conclusiones.....	27
Bibliografía.....	28

INTRODUCCIÓN

Para la evaluación cualitativa y cuantitativa del endotelio corneal es necesario mencionar que su principal función es mantener una barrera efectiva del humor acuoso, mantener la función adecuada de la bomba metabólica y finalmente la transparencia corneal.

El tamaño, forma y el número de células es indicador de la edad y el grado de estrés al cual se encuentra sometido.

La densidad celular, de forma hexagonal y un bajo coeficiente de variación es la forma normal del endotelio corneal, por otro lado disminución en la densidad celular, con escaso número de células endoteliales y un alto coeficiente de variación es indicativo de estrés endotelial.

Clínicamente la función de la bomba endotelial controla el contenido de agua a nivel del estroma (78%) y el grosor corneal (0.52mm), por lo tanto cualquier compromiso en el número de células, función de barrera y función de la bomba metabólica condiciona edema corneal.

La permeabilidad del endotelio corneal es en función de la edad, debido a la constante pérdida de células endoteliales existe un incremento en la

permeabilidad de la córnea, por lo tanto el proceso de reparación y la integridad de las uniones intercelulares es de vital importancia para mantener la función de barrera a través de la migración celular con un limitado grado de mitosis.

El microscopio especular proyecta un haz de luz a través de la córnea, el cual es reflejado desde una interfase óptica (endotelio y humor acuoso) especularmente (“en espejo”) donde el ángulo de reflexión es igual al ángulo de incidencia.

En el epitelio el haz de luz pasa a través del tejido corneal, parte del mismo puede ser absorbido o bien reflejado por las fibras nerviosas o queratocitos. En el estroma la mayor parte de la luz incidente es transmitida, una pequeña parte es absorbida o dispersada por los organelos celulares, al alcanzar la superficie corneal posterior es transmitida hacia el humor acuoso.

Se presenta un cambio en el índice de refracción en la interfase endotelio – humor acuoso de aprox. 0.022% del total de la luz incidente, la cual es reflejada y captada por el microscopio especular formando la imagen endotelial.

El principal objetivo de la microscopia especular es evaluar el estado del endotelio realizando un análisis morfológico y cuantitativo.

Existen en la actualidad microscopios de no contacto: Bio Optics LMS 12000,

Topcon SP -2000P, Donan: ROBO pachy SP-9000 y Konan ROBO CA SP 8800 los cuales realizan el análisis del endotelio corneal de forma automática o manual digital.

El análisis morfológico cuantitativo de las imágenes especulares se realiza asignando un número a la microfotografía que proporciona una medición del estado del endotelio. Es posible cuantificar varios parámetros: el tamaño celular (área celular o densidad celular), polimegatismo (variación en la forma celular, % de células hexagonales o coeficiente de variación de la forma celular), perímetro celular y forma celular.

Se han utilizado dos parámetros para cuantificar el tamaño celular: área celular promedio y densidad celular (conteo celular). El área celular se expresa en unidades μm_2 por cél. y la densidad celular en unid celulares/ mm_2 .

El método del recuadro consiste en contar el número de células dentro de un recuadro o ventana de un área conocida. El número total de células (conteo celular) es la sumatoria de las células completas e incompletas dentro del recuadro. El tamaño celular se obtiene al dividir el conteo celular sobre el área del recuadro, se deben de tomar un mínimo de 35 células continuas dentro del recuadro aunque la mayoría de los estudios refieren de 50-100 células.

Éste análisis se sugiere realizarlo en un sistema computarizado dentro de los cuales se encuentran Bambi (Bio-Optics, Inc. Arlington, MA) que elimina el problema de contar células fraccionadas, el usuario marca cada célula en la computadora la cual calcula la densidad celular dividiendo el número de células marcadas por el área del recuadro.

Esto disminuye el número de errores al realizar el conteo celular, otro factor asociado a error puede ser la distribución irregular de células a través del endotelio y la zona analizada puede no ser representativa del endotelio corneal.

La principal limitación de la microscopia de luz convencional es que la luz reflejada desde estructuras que rodean el punto de observación oscurece la imagen, produciendo artefactos que disminuyen el contraste y la magnificación en instrumentos como el biomicroscopio es limitado 40 veces su tamaño y su resolución es de aprox. 20 μm , al incrementar la magnificación se produce una imagen borrosa. La observación de la córnea es difícil debido a que es un tejido transparente y solo refleja el 1% de la luz incidente.

El principio del microscopio confocal fue descrito por Minsky, propuso que la iluminación (condensador) y observador (objetivo) se enfocaran en un solo punto (puntos focales comunes), mejorando la resolución del eje axial (z) y lateral (x,y) eliminando la información fuera de foco. Con resolución lateral de 1-2 μm axial

5-10 μm y magnificación de hasta 600 veces su tamaño, proporciona una sección óptica coronal.

El conteo celular endotelial se ha realizado también en microscopia confocal. Al comparar la mayor área analizada con el microscopio especular, un menor número de células son evaluadas por la magnificación que proporciona el microscopio confocal, sin embargo el conteo celular realizado de forma semi automatizada y automatizada se correlaciona bien con los resultados de la microscopia especular.

La información obtenida de la microscopia especular se basa en mediciones de la densidad celular y la apariencia morfológica. Se ha demostrado escasa correlación entre la densidad celular y la capacidad funcional del mosaico endotelial, además de que no existe correlación directa entre la densidad celular y la función endotelial como indicadores del grosor corneal.

Schultz, et al. sugiere que descripciones detalladas de pleomorfismo y polimegatismo son más sensibles que las mediciones del número celular para detectar cambios endoteliales.

La microscopia especular proporciona contraste superior de la imagen,

resolución vertical y lateral comparada con microscopia especular, evaluación en tiempo real de las distintas capas de la córnea, además de no ser afectada por edema corneal y otras alteraciones lo cual representa las mayores ventajas de esta tecnología.

Considerando que la severidad de las alteraciones endoteliales varían de un área a otra dentro del mismo ojo se menciona que el microscopio confocal tiene la ventaja de evaluar la totalidad de la córnea proporcionando una mejor apreciación cuantitativa del endotelio.

Con ambas técnicas es posible detectar pleomorfismo y polimegatismo, sin embargo la microscopia especular permanece como una herramienta indispensable para la evaluación del endotelio, ya que al compararla con el microscopio confocal su uso es más fácil y no requiere curva de aprendizaje.

JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito que los resultados del conteo celular endotelial realizado con el microscopio confocal son similares a los resultados obtenidos con la microscopia especular.

Aún cuando existen diversos reportes que comparan los resultados obtenidos en la evaluación del endotelio corneal con ambos tipos de microscopia no se ha reportado alguno que compare estos dos métodos evaluando parámetros cuantitativos con un número significativo de pacientes sanos.

HIPÓTESIS

En la evaluación cuantitativa del endotelio corneal realizada con microscopia especular y microscopia confocal los resultados obtenidos con ambos métodos son similares y por lo tanto son comparables.

OBJETIVO

Comparar las imágenes del endotelio corneal obtenidas con microscopia especular y microscopia confocal a través de un análisis cuantitativo y determinar si existe relación de los resultados obtenidos entre ambos métodos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, descriptivo, observacional y comparativo.

Se incluyeron pacientes voluntarios sin patología ocular o antecedente quirúrgico, se realizó microscopia especular de no contacto utilizando el microscopio Topcon SP 2000 P (Topcon Corp., Tokio, Japan) y microscopia confocal utilizando Confoscan 3 (Nidek Technologies, Advanced Vision Information Sistem) Ver 3.4.1. en todos los pacientes.

Se obtuvieron imágenes (0.2x0.5mm con magnificación 170x del instrumento) del área central de la córnea en cada ojo analizado con microscopio especular de no contacto (SP 2000P Topcon), posteriormente se realizó conteo celular manual de 50 células en cada imagen, los datos fueron calculados por el programa computarizado incorporado (Endotelial Cell Analysis Module) en IMAGEnet 2000.

La microscopia confocal se realizó con Confoscan 3 (Nidek Technologies) equipado con lente de 40x75 aplicando tetracaína como anestésico tópico.

La evaluación del endotelio se realizó con el software integrado "NAVIS Endo Cell Analisis Software" Ver 3.1.0 seleccionando un área de interés (ROI area)

elegida de forma automática por el instrumento basada en la magnificación del lente expresada en micras cuadradas y la resolución de las imágenes suficientemente nítidas para su evaluación, seleccionado 50 células y realizando el análisis celular endotelial en dos modalidades: conteo celular automático y conteo celular manual.

Se realizó un análisis morfológico cuantitativo de endotelio corneal con los siguientes parámetros en microscopia especular y confocal: densidad celular (células/mm₂) modo manual y automático, tamaño celular mínimo (μm), tamaño celular máximo (μm), tamaño celular promedio (μm), desviación estándar y pleomorfismo.

El análisis estadístico se realizó con la prueba de los signos y la prueba de Wilcoxon para medir y contrastar, estadísticamente las diferencias de los dos microscopios con el programa estadístico SPSS Ver 12.1.

RESULTADOS

Se incluyeron 80 ojos de 42 pacientes sin antecedente de patología ocular o cirugía previa.

22 pacientes sexo masculino, 20 de sexo femenino, edad promedio 35 años (rango 18-56 años) 42 OD y 38 OI.

En los sujetos analizados la microscopia especular y confocal generó una imagen similar del endotelio corneal.

A continuación se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de células endoteliales con ambos tipos de microscopios:

Tabla no. 1

Microscopia Confocal

Densidad celular (Cél/mm²) promedio Modo automático	Densidad celular (Cél/mm²) promedio Modo manual	Tamaño celular mínimo promedio (μm²)
2818	1998	185.7

Tamaño celular máximo promedio (μm²)	Tamaño celular promedio (μm²)	Desviación estándar promedio (μm²)	Pleomorfismo Promedio (%)
756.4	363.2	165.2	44.7

Tabla no. 2

Microscopia Especular

Densidad celular (Cél/mm²) promedio	Tamaño celular mínimo promedio (μm²)	Tamaño celular máximo promedio (μm²)
2311	225.1	838.1

Tamaño celular promedio (μm²)	Desviación estándar promedio (μm²)	Pleomorfismo Promedio (%)
441.0	143.4	31.8

Al realizar el análisis estadístico para comparar los resultados obtenidos en densidad celular promedio entre microscopia especular y microscopia especular se observa que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.000$), observando la misma tendencia al realizar comparación entre las dos formas de análisis con los que cuenta el microscopio confocal (conteo celular modo manual / automático) ($p < 0.000$).

Al comparar el tamaño celular promedio entre ambos tipos de microscopia, así como el pleomorfismo con ambos tipos de imagen si existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.000$) en la variación de la forma hexagonal al analizar en todos los casos un área promedio en el microscopio confocal de 0.232 mm.

DISCUSIÓN

La utilidad clínica de la microscopia confocal y especular se considera que es similar al analizar el endotelio en córneas normales. La microscopia confocal es superior en la evaluación del endotelio en patología corneal.

En corneas transparentes el endotelio es ópticamente transparente lo que permite la observación del mismo independientemente de las diferencias en el principio óptico de ambas técnicas. La forma normal poligonal de las células endoteliales está organizada de tal forma que todas se encuentran compactadas en un mínimo espacio, sin embargo no es constante una organización uniforme lo cual está determinado por la edad del individuo.

En este estudio se realiza una comparación entre las dos técnicas que existen actualmente para la evaluación del endotelio corneal utilizando parámetros que permitan la exacta comparación de ambos métodos. Se realizó el análisis de 50 células endoteliales aún cuando el fabricante del microscopio especular recomienda un análisis de un mínimo de 25 células y el del microscopio especular un mínimo de 35 células. Se ha reportado que el análisis es más reproducible al realizar el conteo celular con al menos 50 células.

Klais y et al, publicó el primer estudio en 1998 que realizó la comparación de

conteo celular endotelial entre ambos tipos de microscopia y menciona que los resultados obtenidos son similares.

La densidad celular promedio en microscopia especular y microscopia confocal (modo manual y automático) muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.000$) por lo que los resultados obtenidos entre ambas técnicas no son comparables, observando la misma tendencia en todos los parámetros analizados (tamaño celular mínimo, tamaño celular máximo, tamaño celular promedio y pleomorfismo).

Estos resultados son contrarios a los que reporta la literatura ya que en diversos reportes se ha mencionado que los resultados obtenidos entre ambas son similares, sin embargo el parámetro que se utiliza para realizar la comparación es solamente la densidad celular.

Hara et al, reporta que en sujetos sin patología corneal la imagen y los resultados obtenidos por microscopia especular son comparables a los obtenidos con microscopia confocal, sin embargo este estudio analiza un número limitado de pacientes (28 ojos) y al mismo tiempo realiza una comparación en sujetos con Distrofia de Fuchs (14 ojos) en los cuales la imagen obtenida por microscopia especular no es valorable debido a la poca reflexión de la luz reportando que la

calidad de la imagen de la microscopia confocal es superior en estos casos.

El análisis en el SP2000 se realiza en un recuadro de un área conocida el cual se centra en la imagen, para realizar el conteo celular se requiere la identificación del centro de al menos 10 células contiguas en la imagen endotelial y seleccionarlás en la pantalla. El software mide la distancia que existe entre el centro de cada célula y calcula el área celular y la densidad celular.

Para el análisis en la microscopia confocal se requiere una imagen lo suficientemente nítida para que pueda ser analizada utilizando los bordes de cada célula por la detección de la diferencia de contraste entre las células y los bordes intercelulares en una imagen blanco y negro, en base a eso poder determinar con el análisis automático la densidad celular, la máquina selecciona y sugiere un área de interés (ROI area) la cual puede ser modificada por el observador incrementando o disminuyendo su tamaño para realizar un análisis de por lo menos 50 células. La evaluación y análisis se realiza utilizando un código de colores que se asigna a cada célula por su tamaño (rojo anormal, verde normal y amarillo sospechosa).

La calidad de la imagen influye definitivamente en el análisis debido a que cuando los bordes de la célula no pueden ser delimitados con exactitud el programa lo analiza como una célula de mayor tamaño.

También el tamaño del recuadro puede influir en el resultado de densidad celular debido a que para realizar el cálculo toma en cuenta el número de células endoteliales / área de interés.

Respecto al número de células seleccionadas para el análisis Doughty, et al menciona que la confiabilidad de la estimación de la densidad celular al seleccionar un mínimo de 75 células en cada microfotografía produce resultados similares y con poca variación que cuando se seleccionan todas las células disponibles en la imagen, sin embargo estos resultados son poco reproducibles cuando la selección manual es baja.

Sturrock reporta que la variación de la densidad celular es mayor en individuos mayores de 50 años o cuando la densidad celular es $< 2300 \text{ cel/mm}_\mu$.

La aplicación práctica del análisis del endotelio corneal ha sido evaluada en diversos reportes en los cuales se ha encontrado que los diferentes métodos disponibles de forma comercial en la actualidad proporcionan variaciones importantes en la estimación de la densidad celular.

CONCLUSIÓN

Existen diferencias significativas en el análisis del endotelio corneal con ambos tipos de microscopios, por lo tanto se considera que los resultados entre ambos no son comparables.

En este estudio no existe una tendencia para sugerir el uso de uno u otro microscopio para el análisis del endotelio corneal, esto debe realizarse de acuerdo a las ventajas de cada uno de estos métodos y seleccionarse en base a información clínica que se desee obtener.

BIBLIOGRAFÍA

Laing R. Clinical Specular Microscopy

Cavanagh H., et al. Specular microscopy, Confocal Microscopy and ultrasound biomicroscopy. *Cornea* 2000;7:12-722

Jalbert I, Stapleton F. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol* 2003;87:225-236

Klais C, Kohnen T. Comparison of endothelial cell count between confocal and specular microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (ARVO Abstract) 1998;39: S1031

Chiou A, Kauffman S. Confocal microscopy in cornea guttata and Fuchs endothelial dystrophy. *Br J Ophthalmol* 1999;83:185-189

Onho K, et al. Comparison of recording System and analysis Methods in specular Microscopy. *Cornea* 1999;4:416-423

Mustonen R, et al. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea*; 1998;5:485-792

Doughy M, et al. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell density estimates using a non contact specular microscopy. *Cornea*;2000;19:148-158

Hara M, et al. Comparison of confocal biomicroscopy and non contact specular microscopy for evaluation of the corneal endothelium. *Cornea*; 2003;22:512-515

Van Schaick W, et al. Validity of endothelial cell analysis methods and recommendations for calibration in Topcon SP 2000. *Cornea*;24:538-544