



Universidad de Valladolid



Máster en Investigación en Ciencias de la Visión
Curso Académico 2018-2019

Universidad de Valladolid (Uva)
Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA)

Trabajo de Fin de Máster

Validación de un método para evaluar la eficacia de medidas terapéuticas en la reducción de la neovascularización corneal

Alumna

María Fernanda Moreno Moreno

Tutoras

Dra. Marina López Paniagua

Dra. Margarita Calonge Cano

Valladolid, 21 de junio de 2019

Índice

1.	Resumen.....	4
2.	<i>Abstract</i>	5
3.	Abreviaturas.....	7
4.	Introducción.....	8
5.	Justificación.....	13
6.	Hipótesis.....	14
7.	Objetivos.....	14
7.1.	Objetivo general.....	14
7.2.	Objetivos específicos	14
8.	Materiales y métodos.....	15
8.1.	Análisis estadístico	18
9.	Resultados.....	20
9.1.	Análisis de la repetibilidad y la reproducibilidad del método propuesto para medir la neovascularización corneal superficial.....	21
9.2.	Análisis de la similitud del nuevo método propuesto para la medida de la neovascularización corneal superficial con la escala de Efron.....	22
9.3.	Clasificación para establecer el grado de severidad de la neovascularización corneal superficial en cada paciente.....	25
9.4.	Comprobación de que el método validado permite evaluar la eficacia de medidas terapéuticas en la reducción de la neovascularización corneal superficial	25
10.	Discusión.....	31
10.1.	Limitaciones del trabajo.....	34
11.	Conclusiones.....	36
12.	Bibliografía.....	37
13.	Anexos.....	41
13.1.	Anexo 1	41
13.2.	Anexo 2	44
13.3.	Anexo 3	46
13.4.	Anexo 4	47
13.5.	Anexo 5	48

Resumen

Objetivo. El objetivo de este trabajo fue estandarizar y validar un método que permitiera la evaluación de la neovascularización (NV) corneal, concretamente la NV corneal superficial (NVCs), para poder demostrar la eficacia de las diferentes opciones terapéuticas para tratar este signo clínico.

Materiales y métodos. Se analizaron fotografías de pacientes afectados por NV corneal tratados con trasplante de células madre en el IOBA, Universidad de Valladolid. Haciendo uso del programa *ImageJ*, se midió el porcentaje del área con NVCs, en dos ocasiones por un mismo observador (repetibilidad) y, posteriormente, por un segundo (reproducibilidad). Además, se compararon las medidas realizadas con este método con las medidas de la NV corneal obtenidas con la escala de Efron usada previamente. A partir del nuevo método, se propuso una clasificación de grado de severidad de la NVCs. Además, se realizó el análisis de la NVCs en 20 pacientes afectados por síndrome de insuficiencia limbar (SIL) y tratados con trasplante de células madre, para comprobar si el nuevo método permitía evaluar la eficacia de medidas terapéuticas en la reducción de la NVCs, efecto previamente analizado por la escala de Efron. La evaluación de dicho signo se realizó antes del trasplante, a los 6 y a los 12 meses. Para el análisis estadístico, se usaron los programas R versión 3.5.3 y SPSS versión 23.0.0.0.

Resultados. Se observó que el método de análisis cumple los criterios de repetibilidad y reproducibilidad. El nuevo método resultó ser concordante con la escala de Efron. Por otro lado, utilizando las medidas de porcentaje del área con NVCs, no hubo diferencias significativas entre la NVCs antes el trasplante y tras 12 meses (p -valor 0,263), pero sí entre la NVCs antes del trasplante y a los 6 meses de seguimiento (p -valor 0,026). En términos generales, sin embargo, las diferencias observadas en la NVCs, a lo largo del tiempo, cuando se evaluó con la escala de Efron, no alcanzaron significancia estadística con el nuevo método de evaluación.

Conclusiones. El nuevo método empleado para medir la NV corneal es repetible y reproducible, lo que le otorga validez. Es simple, rápido, preciso y accesible. Aunque han de mejorarse algunas limitaciones, parece ser una herramienta útil para la evaluación de la NV corneal y poder así demostrar la eficacia de las diferentes opciones terapéuticas.

Abstract

Objective: The aim of this project was to standardize and validate a new method to evaluate corneal neovascularization (NV), specifically the superficial corneal NV (sCNV) so that the efficacy of different therapeutic options can be more clearly demonstrated.

Methodology: Photographs of patients affected by corneal NV and treated with stem cell transplantation at IOBA, University of Valladolid, were analyzed. Using the ImageJ software, the percentage of the area affected by sCNV was measured twice by the same observer (repeatability) and a third time by a different observer (reproducibility). These measurements were compared to the corneal NV measurements obtained with The Efron scale. From this new method, a severity degree classification of the sCNV was proposed. In addition, the analysis of 20 patients suffering from stem cell deficiency and treated with limbal epithelial stem cell transplantation was performed, with the purpose of verifying that the new method allowed the evaluation of the efficacy of therapeutic measures in the reduction of sCNV, which had previously been analyzed by the Efron scale. The evaluation of this sign was made before the transplant and at 6 and 12 months post-surgery. For statistical analysis, the programs R version 3.5.3 and SPSS version 23.0.0.0 were used.

Results: It was observed that the analysis method achieves the criteria of repeatability and reproducibility. The new method was concordant with the Efron scale. Additionally, using the percentage of the area with sCNV, there was no significant difference between the sCNV before the transplant and that shown 12 months later (p-value 0.263); however, this difference was significant comparing values pre-surgery with values at month 6 post-transplant (p-value 0.026). In general, the differences in the sCNV observed, over time, by the Efron scale did not reach statistical significance when measured with the new proposed method.

Conclusions: The new method proposed to measure corneal NV is repeatable, reproducible, simple, fast, accurate and accessible. Even though it is mandatory to overcome some limitations, it is a potential useful tool for the evaluation of corneal NV and consequently to demonstrate efficacy of different therapeutic options.

Palabras clave: “neovascularización corneal clínica”, “neovascularización corneal cuantitativa”, “evaluación de la neovascularización corneal”, “modelo *in vivo* de neovascularización corneal”, “área de neovascularización corneal” y “deficiencia de células madres limbares”.

Keywords: “clinical corneal neovascularization”, “quantitative corneal neovascularization”, “evaluation of corneal neovascularization”, “in vivo model of corneal neovascularization”, “corneal neovascularization area” y “limbal stem cell deficiency”.

Abreviaturas

CCI: coeficiente de correlación intraclase.

CEIm: Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos.

CV: coeficiente de variación.

IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

IOBA: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada.

LoAs: límites de acuerdo.

MA: "*monotonic agreement*". Acuerdo monótono.

NV: neovascularización.

NVCs: neovascularización corneal superficial.

RC: "*relative concentration*". Concentración relativa.

RP: "*relative position*". Posición relativa.

SIL: síndrome de insuficiencia límbica.

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*. Factor de crecimiento endotelial vascular.

Introducción

La neovascularización (NV) corneal se define como la presencia de vasos sanguíneos dentro de la córnea, la cual es siempre avascular en condiciones normales.¹ Es un signo patológico que acompaña a diversos problemas de la superficie ocular en general y de la córnea en particular. La presencia de neovasos en la córnea compromete el estado de privilegio inmune de la misma y reduce la transparencia del tejido con pérdida secundaria de agudeza visual,² asociada a causas principales de ceguera debida a enfermedad corneal.

Cómo cualquier tejido, la córnea requiere de sostén nutricional. En condiciones normales, el humor acuoso, la película lagrimal y los vasos sanguíneos que llegan hasta la región del limbo cumplen esta función. Además, los vasos sanguíneos juegan un papel crucial en la defensa de cualquier tejido, respondiendo a estímulos paracrinos y neuronales generados por una lesión. Cuando la córnea se encuentra bajo algún tipo de estrés, ésta puede ser invadida por vasos sanguíneos (NV), que invaden el tejido corneal para intentar cumplir este papel de defensa.³ La NV corneal puede desarrollarse en diversas circunstancias anormales; sin embargo, la mayoría de las patologías que conducen al desarrollo de la NV corneal están asociadas con hipoxia, inflamación, infección, lesión traumática y mal funcionamiento del limbo.⁴

El limbo esclero-corneal es la zona de transición que corresponde a la unión entre el tejido corneal y esclero-conjuntival, encargado de mantener la homeostasis de la córnea. Las principales funciones del aspecto exterior del limbo son aportar parte importante de la nutrición corneal, actuar de barrera inmunológica, evitar la invasión de epitelio conjuntival sobre la córnea y hacer posible la regeneración y reparación del epitelio corneal.⁵ Además, las células madres ubicadas en las capas basales del epitelio limbar son las responsables de la regeneración fisiológica y reparación tras algún daño del epitelio corneal.⁶ Cuando se produce la disfunción o la pérdida de estas células, se origina el denominado síndrome de insuficiencia limbar (SIL), que se caracteriza por la aparición de opacificación y ulceración corneal, así como por la aparición de conjuntivalización (pannus), proceso que se caracteriza

por la presencia de tejido conjuntival invadiendo la córnea, tejido que es traslúcido y no transparente y que tiene vasos sanguíneos que, inevitablemente, invaden la córnea dando lugar a la NV corneal.

Los tratamientos de la NV corneal incluyen esteroides tópicos para inhibir la quimiotaxis de células inflamatorias y citoquinas; estenosis inducida de los vasos sanguíneos por electrocoagulación o láser y, en ocasiones, intervenciones quirúrgicas. Actualmente, existen nuevos enfoques antiangiogénicos, con el uso de anticuerpos anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).³ Por otro lado, en patologías en las que la NV corneal es originada por la disfunción de las células madres del epitelio limbar, como en el SIL, el trasplante de células epiteliales limbares cultivadas *in vitro* es el tratamiento más utilizado en la actualidad. En estos casos, la NV corneal disminuye cuando se trata al paciente con esta terapia y se logra un éxito terapéutico.⁷⁻¹⁰ Recientemente, el grupo de investigación en superficie ocular (GSO – Grupo de Superficie Ocular) del IOBA ha demostrado que esta NV corneal puede ser también tratada de forma exitosa no solo con el trasplante de células limbares alogénicas, sino igualmente con el trasplante de células madre mesenquimales procedentes de médula ósea, siendo éste el primer ensayo clínico realizado con células mesenquimales a nivel ocular.¹¹

Habitualmente, la NV corneal es diagnosticada en las consultas de oftalmología, mediante observación con lámpara de hendidura. En ocasiones, cuando se quiere hacer un estudio más exhaustivo, como puede suceder durante el desarrollo de un ensayo clínico, se requiere cuantificar la NV corneal, acción para la cual existen diferentes metodologías, aunque ninguna de ellas está actualmente aceptada como estándar. Con el objetivo de conocer los métodos utilizados para la evaluación de la NV corneal en el ser humano, se realizó una búsqueda bibliográfica sistematizada en la base de datos MEDLINE a través de PubMed (US National Library Medicine – National Institutes of Health), incluyendo las palabras clave: *“clinical corneal neovascularization”, “quantitative corneal neovascularization”, “evaluation of corneal neovascularization”, “in vivo model of corneal neovascularization”, “corneal*

neovascularization area” y *“limbal stem cell deficiency”*, obteniendo un total de 2.547 artículos. Tras la revisión de los títulos, en un primer momento, y de los resúmenes, posteriormente, y aplicando criterios de inclusión (como descripción de técnicas *in vivo*, de evaluación, cuantificación, descripción de NV corneal) y de exclusión (como descripción *in vitro* o *ex vivo*, estudios moleculares, histopatológicos, inmunohistoquímicos), se seleccionaron 105 artículos para la revisión del texto completo. De ellos, 56 publicaciones fueron de importancia para la base teórica de este trabajo.

En muchas de esas publicaciones, la toma de fotografías y el análisis posterior de las mismas constituyen el método de evaluación para NV corneal. Habitualmente, la toma de fotografías se realiza utilizando la lámpara de hendidura. También la realización de esquemas manuales tras el examen bajo la lámpara de hendidura, la microscopia confocal *in vivo*,¹² la angiografía con verde de indocianina y fluoresceína² y la angiografía por tomografía de coherencia óptica son utilizadas para este fin.¹³ Así mismo, existen programas computarizados de apoyo como *ImageJ*, *PhotoShop*, *Matlab*,^{14,15} *Analyzer Image System Leica Qwin 550*[®] (procesamiento y análisis de imagen, especial para microscopia cuantitativa),¹⁶ *Cell^f: Olympus Soft Imaging Solutions GmbH* (basado en el manejo de filtros verde y rojo)¹⁷ e *Image Pro-Plus*,¹⁸ entre otros, que ayudan en el procesamiento de las imágenes obtenidas por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente. En la tabla 1 se encuentran recogidos algunos de los métodos de medición de la NV corneal más recientemente utilizados en base a una fotografía digital a color tomada mediante la lámpara de hendidura.

Tabla 1: Métodos de medida de la neovascularización (NV) corneal publicados

Publicación	Software de apoyo	Mediciones
Tatham A et al., 2015 ¹⁹	Se creó un <i>software</i> utilizando el lenguaje de programación C ++, haciendo uso de la biblioteca de procesamiento de visión de código abierto <i>OpenCV</i>	Área de NV corneal: por la suma de áreas de cada uno de los vasos Además, se propone la medición del área opacificada

Kim J et al., 2013 ²⁰	<i>Image J software (Wayne Rasband of the Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Área de NV corneal: trazando los límites de cada vaso y sus ramas visibles - Longitud de la NV corneal: distancia entre el plexo vascular del limbo hasta el punto inicial del nuevo vaso. - Ancho de la NV corneal: el diámetro medido en todos los vasos.
Ribeiro J et al., 2012 ²¹	Se desarrolló un <i>software: SQAN-Angiogenesis Quantifier System</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Área de NV corneal - Longitud total de los vasos - Número de vasos sanguíneos
Zakaria N et al., 2012 ¹⁴	<i>Matlab program (versión 6, The MathWorks, MA, USA)</i>	Se asigna un color a cada vaso sanguíneo según diámetro. Los vasos grandes en rojo, los vasos de tamaño mediano en verde y los pequeños en azul. Posteriormente se representa el área porcentual cubierta por cada tipo de vaso.
Dastjerdi M et al., 2009 ¹⁵	<i>Photoshop® CS2 Adobe Systems Inc. & Matlab®; Mathworks Inc</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Área de NV corneal: total de área que ocupan los vasos sanguíneos por ellos mismos - Calibre de los vasos sanguíneos: diámetro medio aproximado de los vasos sanguíneos - Área de Invasión: fracción del área corneal en la que están presentes los vasos sanguíneos

Además, se han formulado escalas de evaluación cualitativas y semi-cuantitativas que permiten evaluar las imágenes, como las descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Escalas de evaluación de la neovascularización (NV) corneal publicadas.

Publicación	Modo de evaluación	Descripción
Deng, SX et al., 2019 ²²	Presencia de vasos sanguíneos en limbo y en corneal central	<p>I Sin compromiso de córnea central</p> <ul style="list-style-type: none"> A. <50% compromiso limbar B. >50% pero <100% compromiso limbar C. 100% compromiso limbar <p>II Con compromiso de córnea central</p> <ul style="list-style-type: none"> A. <50% compromiso limbar B. >50% pero <100% de compromiso limbar <p>III Compromiso total de la córnea</p>

Palme, C et al., 2018²³	Características de los vasos sanguíneos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vasos recientes activos 2. Vasos antiguos activos 3. Vasos en regresión parcial 4. Vasos maduros 5. Regresión total o vasos fantasma
Claros-Chacaltana, FDY et al., 2017²⁴	Presencia de vasos sanguíneos en cuadrantes	La escala de 0 a 3 (según distribución centrípeta) se aplica a cada cuadrante. Dando una puntuación total máxima posible de 12 en cada ojo
Benayoun, Y et al, 2013¹	Características e interacción de los vasos sanguíneos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vasodilatación perilímbica: dilatación del plexo límbico 2. NV límbica: aumento del número de capilares del plexo límbico 3. NV corneal: >5mm de límite visible de limbo 4. Vasoproliferación corneana: ramificaciones y uniones entre los neovasos
Sotozono, C et al, 2007²⁵	Distribución centrípeta global de los vasos sanguíneos	<ol style="list-style-type: none"> 0 sin vascularización 1 vascularización de córnea periférica 2 vascularización entre cornea periférica y margen pupilar 3 vascularización sobrepasa el margen pupilar
Efron, N et al, 2001²⁶	Longitud de los vasos sanguíneos que penetran el cuadrante inferior izquierdo	Escala de Efron (Anexo 1)
Frucht, J et al, 1984²⁷	Longitud de los vasos sanguíneos	<ol style="list-style-type: none"> 1 engrosamiento de vasos limbares 2 menor de 1mm 3 entre 1.25 y 3 mm 4 más de 3.25 mm

Entre las escalas semi-cuantitativas para la valoración de la NV corneal, cabe destacar el método de clasificación planteado por Nathan Efron^{26,28} a finales de los años 90 que, a día de hoy, continúa en uso. Se trata de una escala de graduación desarrollada para evaluar la severidad de complicaciones por el uso de lentes de contacto, en la que se observan 16 signos clínicos, dentro de los que se incluye la NV corneal. La escala consta de 5 grados representados en ilustraciones (ver Anexo 1); siendo 0 normal y 4 compromiso severo. Aunque inicialmente la escala fue diseñada para valorar las complicaciones relacionadas con

el uso de lentes de contacto, dentro de las que se incluye la NV corneal, en la actualidad se utiliza de forma habitual en la valoración clínica de la NV corneal independiente de su causa.

En este contexto, podemos afirmar que realmente no hay un método cuantitativo asociado a *software* libre y gratuito cuyo uso sea uniforme y esté correctamente validado, para la evaluación de la NV corneal y que permita hacer comparables los diagnósticos clínicos realizados por diferentes profesionales ni los distintos resultados obtenidos por el uso de diferentes tratamientos. Por ello, es necesario validar un método que, sin ser invasivo, permita una aproximación precisa, rápida, simple y accesible, para la evaluación de la NV corneal en la práctica clínica diaria y en los ensayos clínicos.

Justificación

Actualmente se emplean diferentes medidas cualitativas y cuantitativas de evaluación de la NV corneal. Sin embargo, no hay un método científico validado que facilite y homogenice el seguimiento de la NV corneal ni en el contexto de la consulta clínica habitual ni en el contexto de los ensayos clínicos; siendo estos últimos parte fundamental de la investigación y el desarrollo. Además, se hace necesaria la estandarización de un método con el que se pueda analizar no sólo la NV corneal general, sino también distinguir la NV corneal superficial (NVCs) de la profunda, ya que aunque pueden coexistir, cada una es más típica de un grupo de patologías diferentes. En concreto, la NVCs es la que aparece con mayor frecuencia en las patologías de la superficie ocular y más específicamente aún en la patología derivada de la deficiencia de células madre, patología en la que nos centraremos en este trabajo.

La estandarización y validación de un método de evaluación de la NVCs permitirá comparar resultados de diferentes centros clínicos y evaluar de forma más precisa y objetiva los efectos de las distintas modalidades de tratamiento existentes contra la NV corneal.

Hipótesis

Es posible establecer un método estandarizado y validado para el análisis de la NVCs, que pueda ser utilizado por los profesionales sanitarios en su práctica clínica diaria y en los ensayos clínicos, de tal forma que dicho método sirva para evaluar la eficacia de las diferentes medidas terapéuticas frente a este signo.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general es estandarizar y validar un método que, siendo simple, rápido y accesible, sin perder precisión, permita la evaluación de la NVCs, en el abordaje inicial de cada paciente y al evaluar los diferentes resultados terapéuticos.

Objetivos específicos

1. Estandarizar y validar un método de evaluación de la NVCs de fácil acceso en la práctica diaria.
 - 1.1. Analizar la variabilidad de la medición de un mismo observador en diferentes tiempos, interpretando así la repetibilidad del método propuesto.
 - 1.1 Analizar la variabilidad de la medición entre diferentes observadores, evaluando con esto la reproducibilidad del método.
 - 1.2 Analizar la similitud de este método de medida de la NVCs con uno de los métodos más utilizados actualmente, como es la escala de Efron
2. Establecer una clasificación que permita indicar el grado de severidad de la NVCs en cada paciente.
3. Comprobar que el método validado permite evaluar la eficacia de medidas terapéuticas en la reducción de la NVCs.

Materiales y Métodos

Las fotografías que han formado parte de este trabajo pertenecen a pacientes diagnosticados de SIL que participaron en el ensayo clínico “Terapias avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular. Trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares (TACM-LE) frente a mesenquimales de médula ósea (TACMMO): ensayo clínico randomizado y doble-enmascarado” (EudraCT 2010-023535-42, *Clinical Trials.gov* - NCT01562002).¹¹ Este proyecto contó con la aprobación de la Comisión de Investigación del IOBA y del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (CEIm) del Área de Salud Valladolid Este. (Ver Anexo 2).

Para validar el método de medida de la NVCs se utilizaron fotografías digitales (sujeto de estudio) obtenidas, como se ha comentado, de pacientes diagnosticados de SIL, que mostraron signos de NVCs y que fueron tratados con trasplante de células madre (bien de epitelio limbar o bien mesenquimales de médula ósea) cultivadas. Las fotografías fueron tomadas previa y posteriormente a la realización del trasplante, en las visitas clínicas correspondientes. Antes de los procedimientos indicados anteriormente, los pacientes leyeron y firmaron el consentimiento informado, en el que se incluye un apartado de manejo de fotografías donde el paciente autoriza la toma de éstas y su uso en publicaciones científicas y en actividades de divulgación científica. Para la realización de este proyecto, las imágenes han sido tratadas con un código numérico, por lo que los evaluadores no conocen la identidad del paciente, al considerarse irrelevante para las cuestiones a tratar.

Las fotografías fueron tomadas durante el examen con lámpara de hendidura (*Topcon SL-8Z, Topcon Corp., Hasunuma-cho, Habasi-ku, Tokyo, Japan*) conectada a una cámara digital (programa *IMAGENet Fuji Fujifilm Finepix S1 Pro. Fuji Photo Film Co., LTD., Tokyo, Japan*).

Para la validación del método de evaluación de la NVCs, se eligieron las fotografías de mejor calidad, de posición anterior con visualización casi total o total del limbo. Según la

estimación estadística previa realizada, el tamaño muestral mínimo para la validación del método debía de ser de, al menos, 12 imágenes. Para la evaluación de la imagen se hizo uso del programa de procesamiento digital *ImageJ 1.51j8* (64-bit Java 1.8.0_112– Wayne Rasband National Institutes of Health - USA – disponible en <https://imagej.nih.gov/ij/> - dominio público).

Para iniciar el análisis de la imagen en el programa *ImageJ* se definió como medida de referencia un diámetro corneal temporo - nasal de 11,7 mm²⁹ (figura 1 A), tras lo cual se midió el área total corneal (figura 1 B) en mm². Posteriormente, se señaló con un punto el final de cada vaso sanguíneo superficial (figura 1 C), considerando que un vaso es superficial cuando presenta un claro trayecto continuo desde la conjuntiva hacia la córnea y su coloración es rojo intenso. Seguidamente, se procedió a unir cada uno de estos puntos, lo que resultó en un área central libre de vasos que, a su vez, se midió (figura 1 D). Conociendo el área total de la córnea, se calculó el área restante, que corresponde a la superficie vascularizada (área total de la córnea – área no vascularizada) y se expresó en términos de porcentaje de NVCs siguiendo la fórmula:

$$\text{Área corneal con NVCs (\%)} = (\text{área vascularizada} \times 100\%) / \text{área corneal total.}$$

Se analizaron 40 imágenes diferentes, dos veces por el mismo observador (observador 1), con diferencia de 1 semana entre ambas mediciones y una vez más por un segundo observador (observador 2). Estas mediciones fueron realizadas para llevar a cabo el análisis estadístico para evaluar la repetibilidad y la reproducibilidad del nuevo método propuesto. (Ver Anexo 3)

A continuación, se comparó la similitud del nuevo método de medida de la NVCs aquí propuesto con la escala de Efron. Cada una de las 40 imágenes analizadas fueron evaluadas, con respecto a la NVCs, utilizando la escala de Efron, evaluación que se realizó durante la revisión clínica de los pacientes.¹¹ Cada una de las medidas tomadas en base a la escala de Efron se correlacionó con cada una de las medidas realizadas por el observador 2 siguiendo el método de medida a validar.

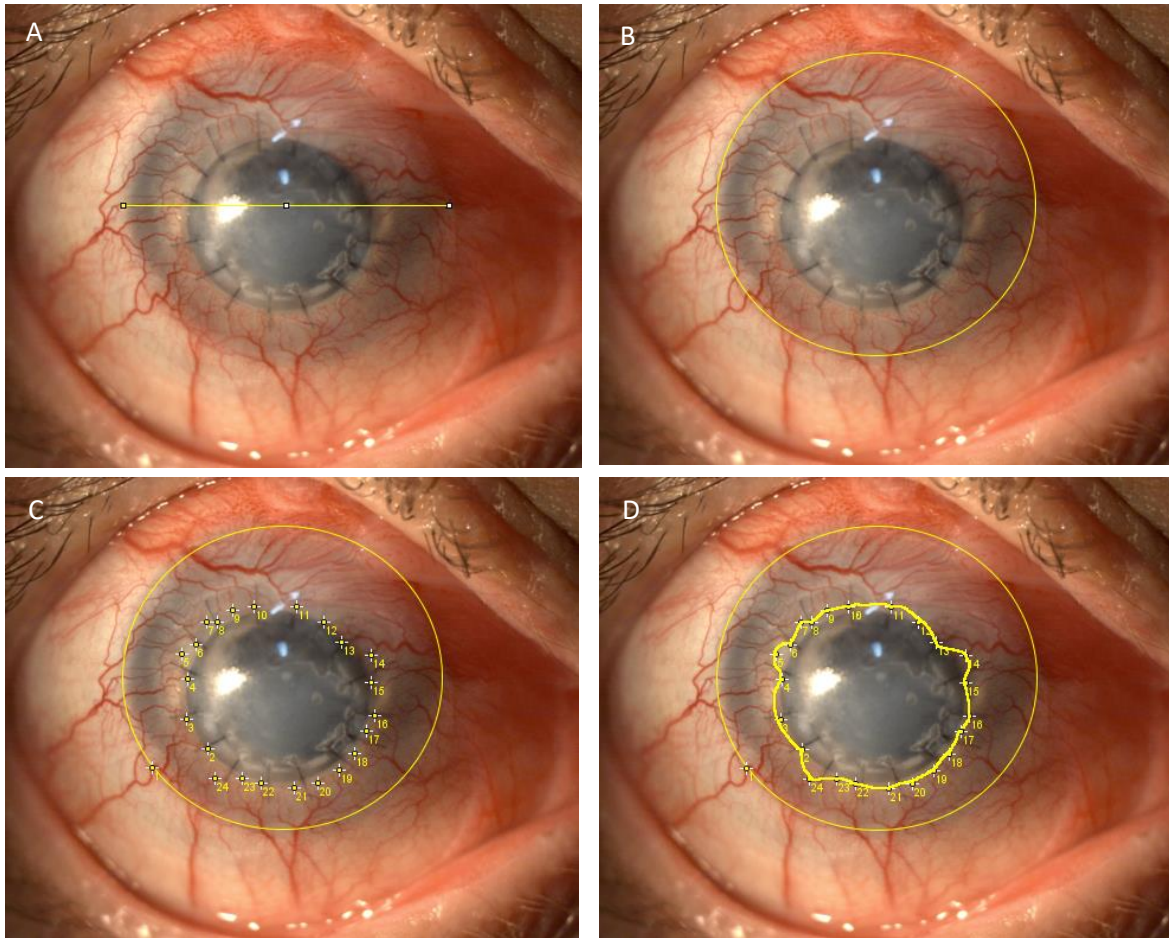


Figura 1: Protocolo seguido para la medición de la neovascularización corneal superficial (NVCs) utilizando el programa de procesamiento digital *ImageJ 1.51j8*. A: diámetro corneal temporo-nasal. B: medida del área corneal total. C: marcaje digital del extremo final de cada vaso sanguíneo superficial. D: medida del área no vascularizada.

Una vez realizadas las mediciones de área de NVCs se estableció una clasificación (tabla 3) utilizando el nuevo método propuesto en este trabajo para la valoración de la NVCs, con rangos equidistantes, de 4 categorías; que fuera útil para asignar un grado de severidad de la NVCs en cada paciente. Además, se buscó que esta nueva clasificación incluyera el compromiso o no de la región central de la córnea (área central de 5 mm de diámetro²²); por lo que a cada categoría se le asignó un signo de suma (+) si se observaba NVCs central.

Tabla 3: Clasificación del área de neovascularización corneal superficial (NVCs) medida por el nuevo método propuesto y su correlación con el grado de severidad.

Área NVCs (%)	Compromiso Corneal Central	Clasificación	Severidad
0-25	no	1	Leve
	si	1+	
25-50	no	2	Moderada
	si	2+	
50-75	no	3	Severa
	si	3+	
75-100	no	4	Muy severa
	si	4+	

Finalmente, se analizó si el nuevo método propuesto permitía evaluar la eficacia de medidas terapéuticas en la reducción de la NV corneal. Para ello, se estudió si dicho método era capaz de detectar el efecto terapéutico del trasplante de células madre cultivadas *in vitro*, con respecto a la NVCs, en pacientes afectados por SIL, efecto previamente analizado por la escala de Efron.¹¹ Se midió el porcentaje de la NVCs antes y después del trasplante celular, analizando las fotografías de cada paciente en tres tiempos distintos, antes de la cirugía del trasplante, a los 6 meses y a los 12 meses después de la misma.

Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron fotografías con el mismo origen que se ha detallado en el objetivo 1. (Ver Anexo 5)

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se contó con el apoyo de la Dra. Itziar Fernández, responsable de la Unidad de Estadística del IOBA. El análisis estadístico de los datos obtenidos en el primer objetivo se realizó con el programa R versión 3.5.3 (*R core Team* 2019), mientras que los datos obtenidos en el objetivo 3 se analizaron con el programa SPSS versión 23.0.0.0 (*IBM SPSS Statistics*).

Para el análisis estadístico realizado en los objetivos 1.1 y 1.2, en los que se trató de evaluar el acuerdo que existe entre mediciones consecutivas del mismo observador y entre dos mediciones de dos observadores diferentes, se comprobó la hipótesis de normalidad utilizando el contraste de *Shapiro-Wilk*. Una vez comprobada dicha hipótesis, se calculó el coeficiente de variación (CV) intra-sujeto. Dentro del estudio de repetibilidad y reproducibilidad se calculó el coeficiente de correlación intraclase (CCI), utilizando la interpretación propuesta por los autores Portney & Watkins³⁰ descrita en la tabla 4. Por otro lado, se realizó el *análisis de Bland-Altman*. Se evaluó también el sesgo entre mediciones utilizando el contraste *t-Student* para muestras pareadas.

Tabla 4: interpretación del coeficiente de correlación intraclase (CCI).

Valor del CCI	Concordancia
≥0,9	Muy fuerte
0,70-0,89	Fuerte
0,50-0,69	Moderado
0,26-0,49	Bajo
≤0,25	Pobre

En el caso del objetivo 1.3, se evaluó el acuerdo entre dos escalas de medida de la NVCs (porcentaje de área corneal con NVCs y escala de Efron). Para ello, se utilizó el coeficiente de correlación de *Spearman* y el coeficiente de acuerdo "*monotonic agreement*" (MA). Además, se comprobó la correspondencia entre las dos escalas, calculando el porcentaje de acuerdo y dos medidas de desacuerdo, la posición relativa ("*Relative Position*", RP) y la concentración relativa ("*Relative Concentration*", RC).

Para analizar los datos obtenidos en el tercer objetivo se aplicó un análisis de varianza para medidas repetidas. Se realizó un análisis con pruebas multivariantes, fijándose en los resultados obtenidos con el *Test Traza de Pillai*. Los valores obtenidos en el objetivo 3 están representados como la media de los valores obtenidos \pm el error estándar de la media.

Resultados

A continuación, se realizó una comparación descriptiva por rangos de porcentaje de NVCs, de las tres mediciones realizadas en cada una de las imágenes analizadas. Se muestran primero las dos mediciones del observador 1 (figura 2) y posteriormente las mediciones de ambos observadores, (figura 3) usando aquí la primera medición del observador 1.

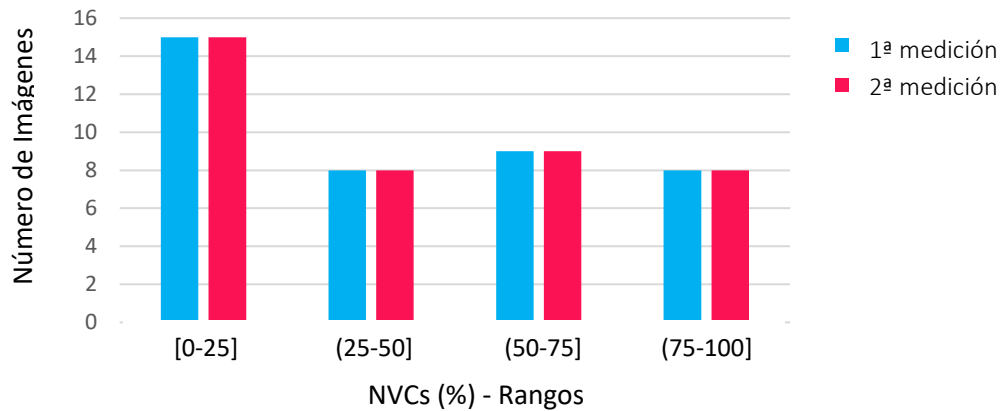


Figura 2: Comparación de la distribución de la muestra (n=40) por rangos de porcentaje de neovascularización corneal superficial (NVCs), en las dos mediciones del primer observador

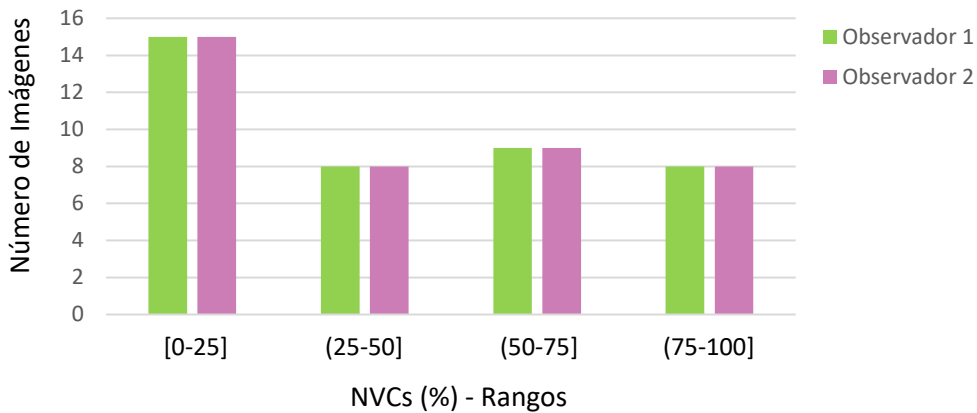


Figura 3: Comparación de la distribución de la muestra (n=40) por rangos de porcentaje de neovascularización corneal superficial (NVCs), en la primera medición del observador 1 y en la medición del observador 2.

En términos generales se observó que la muestra incluía diferentes grados de compromiso de NVCs y, además, que las comparaciones entre medidas intra e interobservador, tenían una distribución similar a grandes rasgos.

Análisis de la repetibilidad y la reproducibilidad del método propuesto para medir la NVCs.

Para iniciar el análisis, tras comprobar la normalidad de la muestra, se retiró uno de los valores que alteraba la misma (fotografía número 6), siempre siguiendo criterios estrictamente matemáticos, por lo que la muestra se redujo a 39 fotografías (n=39).

El cálculo realizado del CV intrasujeto, con respecto a la repetibilidad, permitió establecer como resultado, que cuando la misma imagen es analizada por la misma persona, dicha persona se puede desviar un 14,7% para dar el mismo valor otra vez. Con respecto a la reproducibilidad, los datos indican que cuando una foto era analizada por diferentes personas, la desviación para volver a dar un mismo resultado cuando se evalúa la misma foto era del 22,3%.

Por otro lado, el CCI intraobservador (repetibilidad) fue de 0,9711 (IC 95% 0,9458- 0,9847) y entre observadores (reproducibilidad) de 0,9259 (IC 95% 0,864 - 0,9603), ambas medidas superiores a 0,9, es decir, que la concordancia se puede clasificar como muy fuerte en ambos casos. Con este análisis, se puede deducir que el acuerdo intra e interobservador es muy fuerte. Además, el acuerdo entre dos mediciones de un mismo observador fue mayor que entre dos observadores.

A continuación, se utilizó el *Análisis de Bland-Altman*, (figura 4) para evaluar el grado de concordancia entre las dos medidas consecutivas tomadas por el mismo observador (repetibilidad) y las medidas tomadas por dos observadores diferentes (reproducibilidad). En este análisis se representa gráficamente las diferencias entre las dos mediciones frente a su media y los límites de acuerdo entre los que se encuentran.

Como se puede observar en la figura 4, las diferencias entre observaciones consecutivas del mismo observador y la media están entre -13,02 y 16,24 unidades y las diferencias entre observaciones realizadas por dos observadores distintos y la media entre -25,61 y 19,41 unidades. Por tanto, se puede concluir que las mediciones entre el mismo observador tienen mayor similitud que las mediciones entre observadores, como era de esperar. Por otro lado, el valor de la media interobservadores es negativo, lo que sugiere dos posibilidades: la medición del segundo observador sobreestima el porcentaje de NVCs o bien, la medición del primer observador lo subestima.

Por otro lado, a partir del análisis Bland-Altman, también se pudo observar que no había relación entre el porcentaje de área corneal con NVCs y el error que se comete al realizar las medidas, es decir, el error cometido en las mediciones es independiente de si la NVCs es elevada o baja en las imágenes analizadas.

Además, se utilizó el contraste t-Student y se comprobó que no había sesgo sistemático entre las mediciones consecutivas realizadas por el mismo observador ni entre las medidas obtenidas por dos observadores diferentes.

Análisis de la similitud del nuevo método propuesto para la medida de la NCVs con la escala de Efron.

Una vez validado el método, se procedió a evaluar el acuerdo que existe entre este método de medida para la NVCs y la escala de Efron, siendo ésta una de las escalas más utilizadas actualmente para evaluar la NV corneal en ausencia de un método *“gold standar”* como referencia. Para esta parte del análisis no se contaba con la valoración en escala de Efron de la fotografía 18, por lo que se eliminó reduciendo la muestra a 38 fotografías (n=38).

Para demostrar si ambas escalas son intercambiables o no, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman y el coeficiente de acuerdo MA, observando que en este caso los valores de 0,7886 y 0,8549 respectivamente, son bastante próximos a 1 y significativamente

distintos de 0 (el IC 95% no contiene al 0, $p < 0,05$), lo que quiere decir que hay una correlación fuerte linealmente positiva entre ambas escalas. Como se observa en la figura 5, los intervalos son bastante definidos, salvo en el intervalo correspondiente al valor de Efron 2, que ocupa prácticamente todo el rango de valores en la nueva escala.

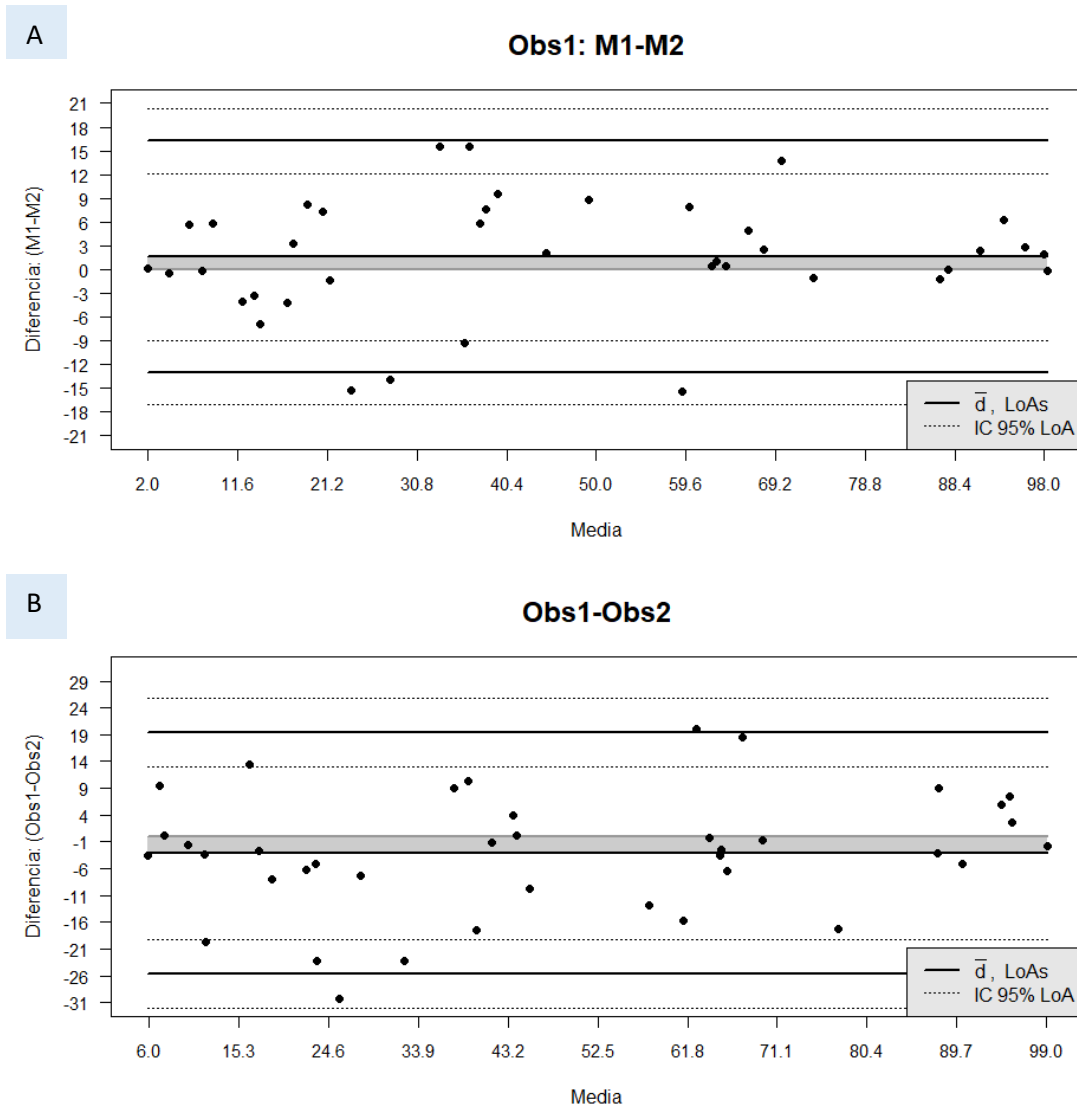


Figura 4: Análisis de Bland-Altman. Se representa la media de las diferencias (\bar{d}) y los límites de acuerdo (LoAs) con sus respectivos intervalos de confianza (IC 95% LoA). A: diferencias entre la primera (M1) y segunda (M2) medición del observador 1. \bar{d} :1,61 LoAs -13,02 y 16,24. B: diferencias entre M1 del observador 1(Obs1) y la medición del observador 2 (Obs2). \bar{d} : -3,1 LoAs -25,61 y 19,41

A continuación, para comprobar la correspondencia entre las dos escalas, se dividió la escala cuantitativa, correspondiente al nuevo método propuesto, en una escala discreta ordinal de 4 categorías. Se estableció esta nueva escala de dos formas posibles: considerando intervalos equidistantes (escala 1) y considerando la transformación que a la vista de los datos sería la que mejor concordancia ofrece (escala 2). En la tabla 5 se resumen los intervalos que se han considerado.

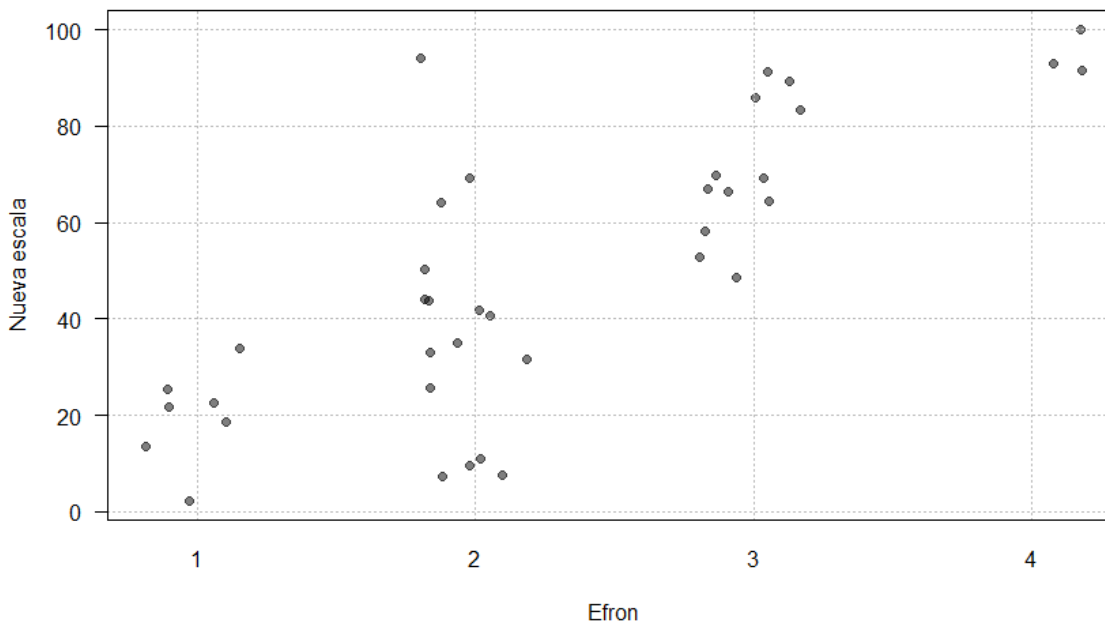


Figura 5: Valores de neovascularización corneal superficial (NVCs) en términos de porcentaje con el nuevo método propuesto (nueva escala), en relación a la escala ordinal de Efron.

Tabla 5: Nuevas escalas ordinales a partir del porcentaje de neovascularización corneal superficial (NVCs).

Efron	Escala 1	Escala 2
1	[0-25]	[0-30]
2	(25-50]	(30-48]
3	(50-75]	(48-91,4]
4	(75-100]	(91,4-100]

Al evaluar la correspondencia con los valores de RP y RC, se observó que ambas escalas clasificaban de forma similar la misma imagen con respecto a la escala de Efron y que esta última se concentraba más en valores centrales, como se logró observar previamente en la figura 5. Adicionalmente, se observó que la escala 2 tuvo mayor porcentaje de acuerdo con la escala de Efron, con un 73,68%, frente a un 60,53% de la escala 1.

Clasificación para establecer el grado de severidad de la NVCs en cada paciente.

Con la nueva clasificación establecida, a partir del nuevo método propuesto (tabla 3), se describe la muestra (n=38) en la figura 6 y, en contraste, se presenta la descripción correspondiente de la misma muestra con la escala de Efron, observándose, una vez más, la gran concentración en el valor 2 de dicha escala.

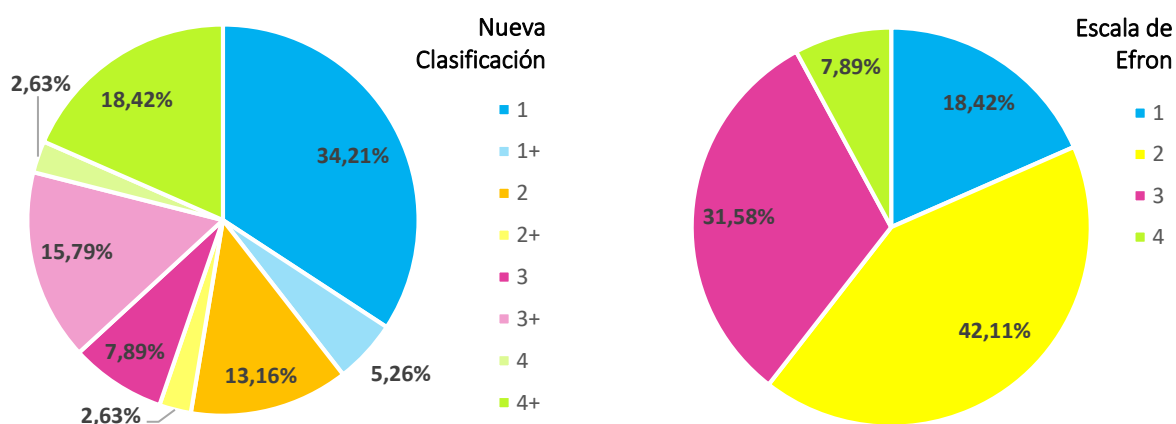


Figura 6. Descripción de la muestra (n=38) según la distribución en la nueva clasificación propuesta en contraste con la Escala de Efron.

Comprobación de que el método validado permite evaluar la eficacia de medidas terapéuticas en la reducción de la NVCs

Se analizó la NVCs, utilizando el nuevo método propuesto en este trabajo, en pacientes afectados por SIL y tratados con un trasplante de células madre (n=20). La NVCs se analizó en los diferentes individuos antes del trasplante (visita 1) y después de 6 y 12 meses (visitas 2 y 3, respectivamente) de la realización del mismo.

La media del porcentaje de NVCs para la visita 1 fue de $42,99 \pm 7,06\%$, para la visita 2 de $35,42 \pm 7,19\%$ y para la visita 3 de $38,36 \pm 6,57\%$. (figura 7). Las diferencias de las medidas de la NVCs en función del tiempo se quedan al borde de la significación, por lo que no se vio una evolución estadísticamente significativa de estos pacientes, con respecto a la NVCs, a lo largo del tiempo.

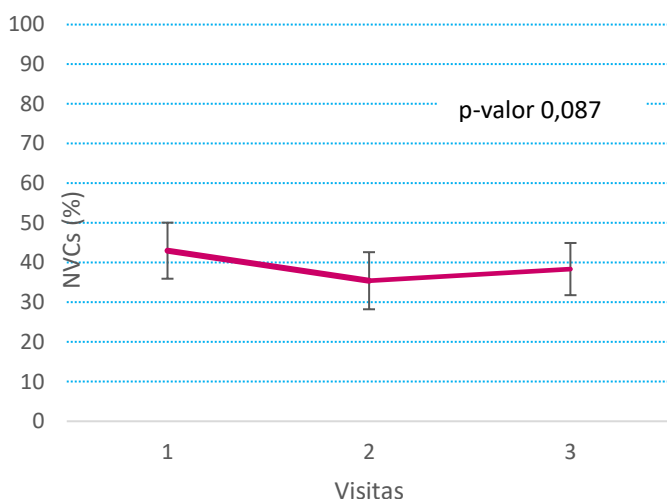


Figura 7: Medias estimadas de la neovascularización corneal superficial (NVCs) en las 3 visitas.

Además, se procedió a evaluar las diferencias entre la visita 1 y 2 y entre la visita 1 y 3, como se observa en las figuras 8 y 9 respectivamente. En el primer caso, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de área de NVCs, con la disminución de la misma ($p\text{-valor}=0,026$); contrario a esto no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la visita 1 y la 3 ($p\text{-valor}=0,263$).

Posteriormente, se analizó si la evolución de los pacientes en el tiempo, con respecto a la NVCs, y que había sido previamente medida utilizando la escala de Efron, se podía detectar de forma similar con el nuevo método de medida de la NVCs propuesto en este trabajo. Para ello, se dividió a los 20 pacientes en 2 grupos según su evolución con respecto a la NVCs, medida con escala de Efron: 1) grupo 1: pacientes que presentaron mejoría, definiendo mejoría como disminución de la NVCs medida con la escala de Efron

y 2) grupo 2: pacientes que no mejoraron o que incluso empeoraron según la misma. Haciendo esta distinción, se establecieron los efectos (positivos, negativos o nulos) del tratamiento en los pacientes, que fueron visibles por medio de la evaluación con la escala de Efron. Una vez se hizo esta diferenciación, se comprobó si la evolución de la NVCs de los pacientes, medida con la escala de Efron, coincidía con la evolución de los pacientes cuando ésta se medía con el nuevo método propuesto.

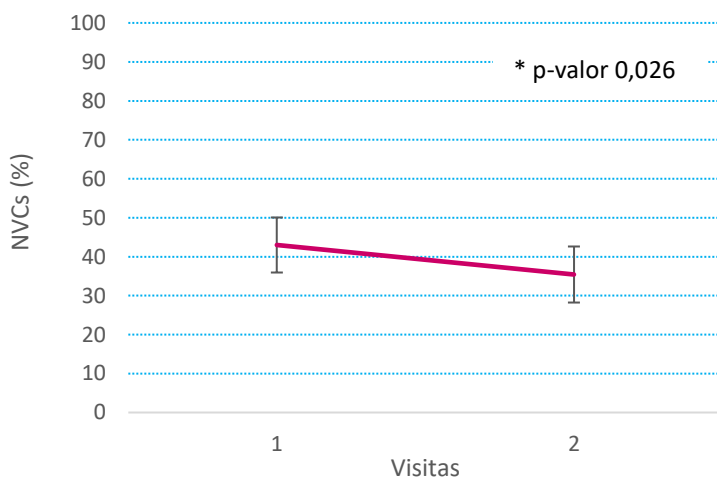


Figura 8: Medias estimadas de la neovascularización corneal superficial (NVCs) en la visita 1 y 2.

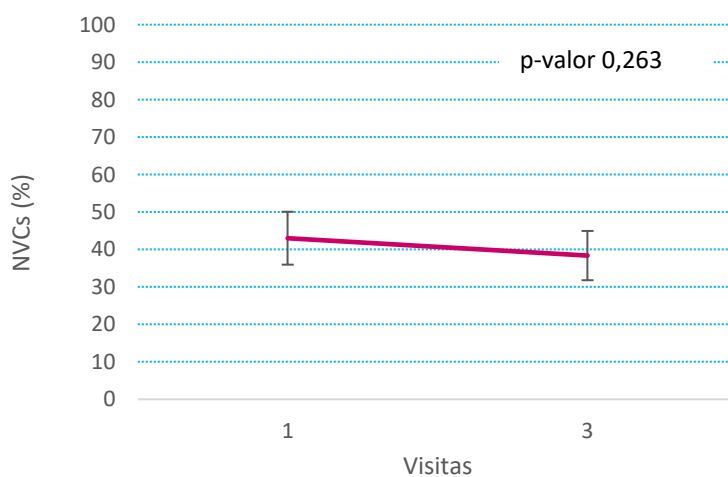


Figura 9: Medias estimadas de la neovascularización corneal superficial (NVCs) en la visita 1 y 3.

En primer lugar, se analizó la evolución tenida en cuenta entre la visita 1 y la visita 3. Tras la realización del análisis estadístico, no se observan diferencias significativas entre los grupos con respecto a su evolución en los 3 distintos momentos (figura 10).

Llama la atención el comportamiento de los pacientes al hacer distinción de los grupos. El grupo 2 tenía un mayor compromiso inicial con respecto al grupo 1. Además, en el grupo 2 hubo una reducción escasa en el área de NVCs en la visita 2, viéndose posteriormente un aumento marcado que superaba incluso el compromiso previo, en contraste, en el grupo 1 se vio una reducción mucho mayor e inmediata en la visita 2, que se mantuvo estable hasta la visita 3.

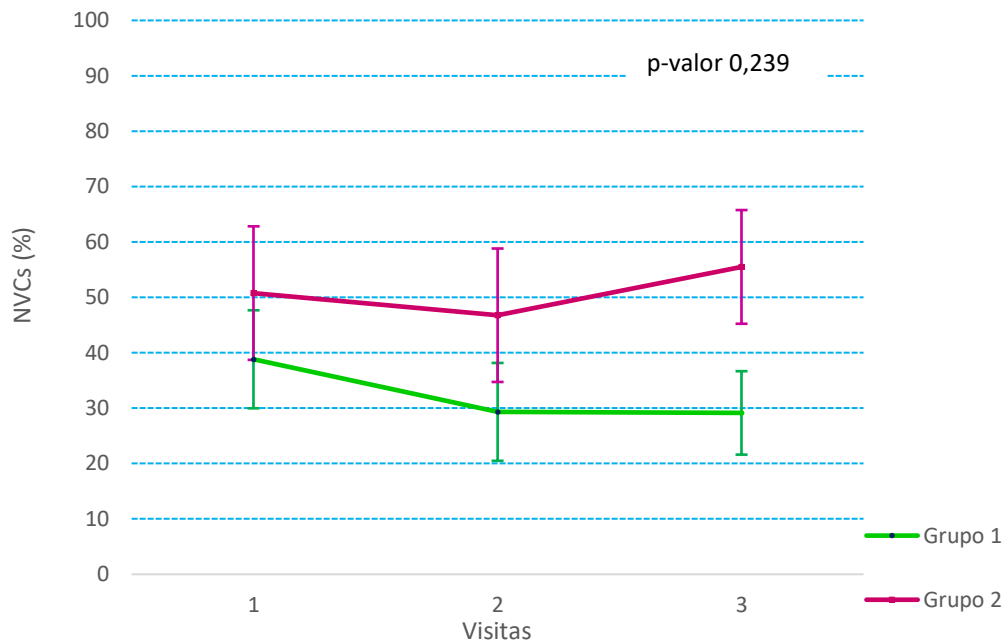


Figura 10: Medias estimadas de la neovascularización corneal superficial (NVCs) en las tres visitas, diferenciadas por grupos según evolución. Grupo 1: mejora, Grupo 2: no mejora o empeora.

A continuación, se analizó la evolución de los pacientes considerando la visita 1 y la visita 2 y se realizó el análisis estadístico evaluando sólo estos dos tiempos. No se observaron

diferencias estadísticamente significativas de la NVCs en ninguno de los dos grupos en relación a los dos momentos evaluados (figura 11).

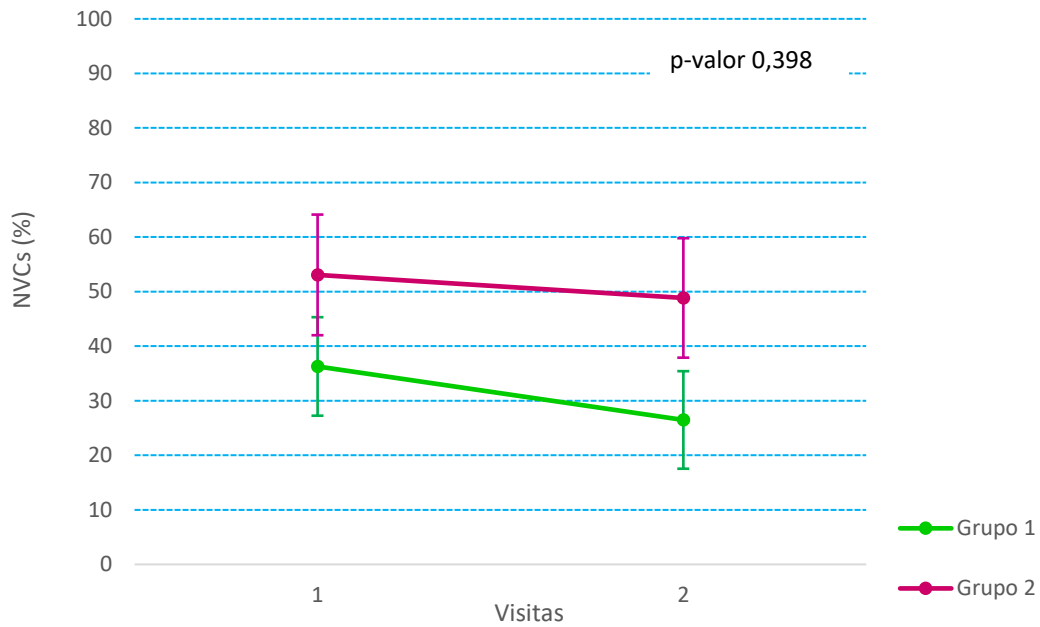


Figura 11: Medias de la neovascularización corneal superficial (NVCs) en la visita inicial y a los 6 meses posterior a la intervención (visita 1 y 2 respectivamente), diferenciadas por grupos según evolución. Grupo 1: mejora, Grupo 2: no mejora o empeora.

Una vez más, se analizó la muestra considerando ahora las valoraciones de las visitas 1 y 3; evaluando solo estos dos tiempos. En esta ocasión, las diferencias de la NVCs entre los distintos grupos con respecto a los dos momentos evaluados, se quedaron al borde de la significación, observándose disminución de la NVCs en el grupo 1, en contraste con el aumento de la misma en el grupo 2 (figura 12); es decir, se observó la misma tendencia con la escala de Efron que cuando se utilizó el nuevo método de medida de la NVCs.

Por último, se analizó la evolución de los pacientes considerando las valoraciones de la visita 2 y la visita 3 y evaluando únicamente estos dos tiempos. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas de la medida de la NVCs entre los grupos de la visita 2 a la 3 (figura 13).

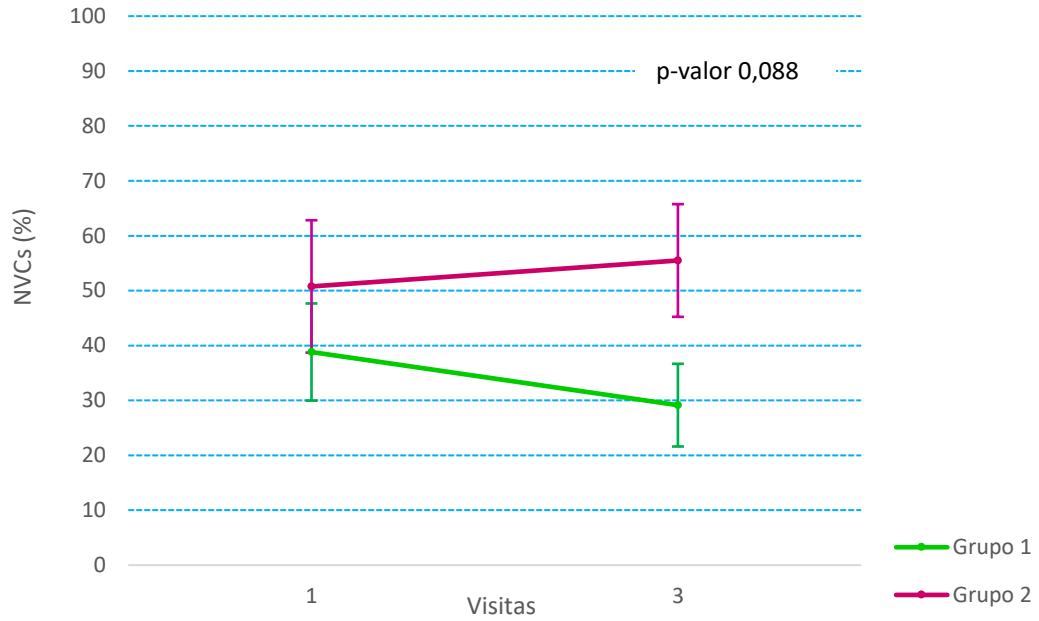


Figura 12: Medias estimadas de la neovascularización corneal superficial (NVCs) en la visita inicial y a los 12 meses posterior a la intervención (visita 1 y 3 respectivamente), diferenciadas por grupos según evolución. Grupo 1: mejora, Grupo 2: no mejora o empeora.

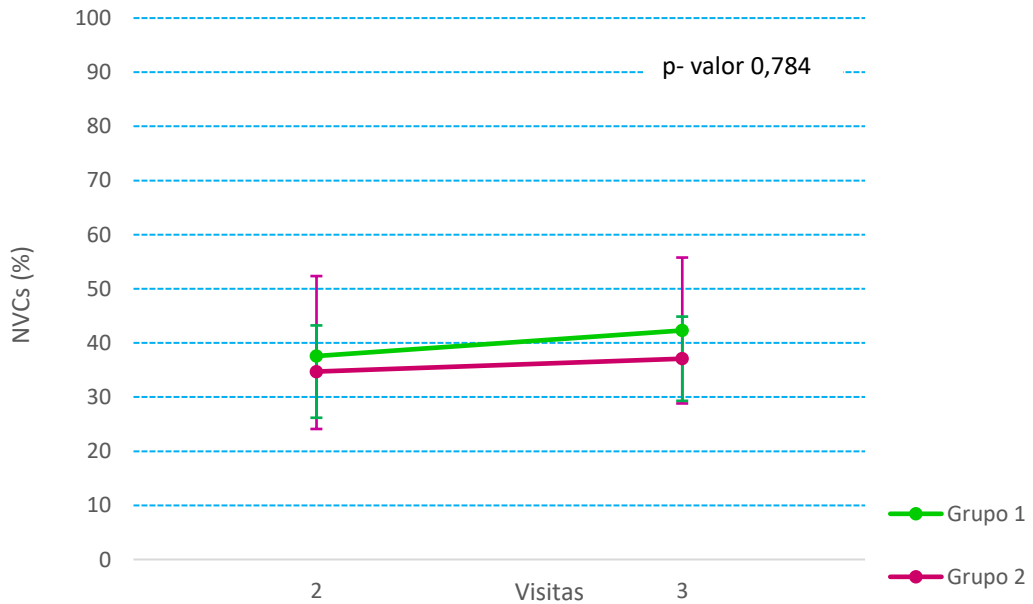


Figura 13: Medias estimadas de la neovascularización corneal superficial (NVCs) en la visita a los 6 y 12 meses posteriores a la intervención (visita 2 y 3 respectivamente), diferenciadas por grupos según evolución. Grupo 1: mejora, Grupo 2: no mejora o empeora.

Con estos resultados, en términos generales, las diferencias en la NVCs observadas por la escala de Efron, no tienen significancia estadística al ser medidas con el nuevo método propuesto, aunque al comparar la visita 1 con la visita 3, las diferencias quedan cerca de la significación.

Discusión

La NV corneal es una complicación de la mayoría de las enfermedades inflamatorias del segmento anterior del ojo. Es un signo frecuente de mal pronóstico y llega a afectar de manera significativa la calidad de vida de quienes la sufren,¹ estando asociada a las principales causas de ceguera corneal. Para su evaluación se han descrito gran variedad de métodos cualitativos y cuantitativos, semi-automatizados y automatizados, sin embargo, ninguno ha sido estandarizado, por lo que la valoración de este signo en la práctica clínica y en el ámbito de la investigación es bastante heterogénea.

El objetivo de estandarizar un método de cuantificación de la NV corneal, concretamente de la NVCs, parte de la necesidad de uniformidad en la valoración durante el seguimiento de la patología, para intercambiar información en la práctica clínica diaria cuando un paciente es valorado por más de un profesional sanitario y, en el ámbito científico, cuando se desean comparar los distintos resultados de ensayos clínicos, siendo un área que está en constante investigación y desarrollo.

Con este trabajo se plantea un método pensado para ser simple, rápido, accesible y preciso. Este es un método cuantitativo lo que supone una ventaja en precisión sobre los que no lo son.^{3,24,25} Además, solo requiere de una imagen fotográfica tomada durante el examen con lámpara de hendidura y un ordenador con un programa informático para análisis de imagen de acceso libre y gratuito como lo es *ImageJ*. De esta manera se evitan el uso de técnicas más complejas propuestas en otros trabajos como la angiografía por tomografía de coherencia óptica¹³ y angiografía fluorescencia con verde de indocianina² y de programas dependientes de especificaciones en los equipos o que requieren licencia para su uso;¹⁷ los

cuales no están disponibles en todos los centros médicos, brindándole accesibilidad a la mayor parte de profesionales sanitarios, lo que apoya el deseo de uso global. Además, usa un apoyo informático que es sencillo, consistiendo en una única barra de herramientas usando sólo 4 de ellas. Esto hace que el tiempo del análisis sea corto por lo que su uso durante la consulta, es posible.

Al determinar los parámetros de la medición, se consideró que calcular el área total de córnea comprometida brinda información clínica relevante en el momento de evaluar la NVCs. Formas contempladas previamente reportadas en la bibliografía, como marcar los límites de cada vaso sanguíneo, medir su calibre o su longitud,^{15,20,21} son maneras complicadas si se hacen manualmente y que requieren más tiempo, lo que no es oportuno al abordar a un paciente en la consulta clínica diaria y que en términos prácticos no supone ventajas. Ahora bien, la idea de usar un programa informático apoya la necesidad de precisión y rapidez, pero en este caso, se utiliza el criterio del observador, siendo éste el que decide al marcar y seleccionar manualmente el área a medir, lo que le permite en caso de dudas apoyarse de la evaluación hecha bajo la lámpara de hendidura. Esto no ocurre cuando se usan métodos automatizados o semi-automatizados que pueden subestimar el compromiso ya que cuentan pixel a pixel discriminando área entre vasos y al no definir adecuadamente áreas de la fotografía que tengan artefactos como reflejos lumínicos, o aquellos pacientes que tienen opacidades corneales que le quitan claridad a los vasos sanguíneos; y que por otro lado a pesar de ser automatizados, según lo reportado en la literatura, en algunos casos consumen más tiempo del deseado.¹⁹

A la luz de los resultados, con el método propuesto se obtuvo un muy fuerte acuerdo entre las mediciones de un mismo observador y las de dos observadores distintos, por lo que se comprueba la validez del método al ser repetible y reproducible.

Además, como era de esperar, el acuerdo entre dos mediciones de un mismo observador fue mayor que entre dos observadores. Sin embargo, se ha visto que cuando una misma foto

es evaluada por una misma persona, es posible que dicho observador se desvíe aproximadamente un 15% para dar otra vez el mismo valor. Este porcentaje aumentó al 22% cuando la evaluación de la misma imagen se realiza entre dos observadores diferentes. Estos dos hallazgos pueden deberse principalmente a limitaciones presentes con respecto a la calidad de cada foto y a las diferencias a la hora de definir vascularización superficial y profunda en las distintas mediciones. Está claro que la fotografía es una imagen en 2 dimensiones, por lo que se pierde la posibilidad de evaluar a ciencia cierta la profundidad de los vasos sanguíneos, lo que en la consulta clínica, haciendo la valoración de la imagen utilizando la lámpara de hendidura, no representa un problema, pudiendo diferenciarse bien entre NV corneal profunda versus NVCs.

Se puede afirmar, que existe un buen acuerdo entre este método y la escala de Efron, siendo intercambiables y teniendo correspondencia; sin embargo, se debe tener presente que la escala de Efron tiende a concentrarse en valores centrales al observar lo ocurrido con la categoría 2, perdiendo aún más precisión, problema que no se presenta con este nuevo método siendo cuantitativo.

Por otro lado, con la clasificación que se propone, se da otro enfoque a la información recibida ayudando al personal sanitario cuando se quiera definir un nivel de severidad; dándole más objetividad a una clasificación cualitativa, al partir de un dato objetivo como el porcentaje de NVCs, lo que puede ser útil tanto en la práctica clínica diaria como en el contexto de la investigación clínica. Además, en este punto se debe considerar el compromiso de la córnea central por su directa relación con el pronóstico visual del paciente, por lo que en la clasificación propuesta está incluido. Y así, se define como córnea central la medida de 5 mm de diámetro propuesta en el *“Global Consensus on Definition, Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency”*²² publicado recientemente en la revista *“Cornea”*. Sin embargo, el tomar esta medida aumenta el tiempo de la valoración, siendo éste un factor limitante. A este respecto, algunos autores sugieren la opción de delimitar la córnea central como la zona correspondiente al margen pupilar,²⁵ dejando atrás

la necesidad de realizar una medida adicional, sin aumentar el tiempo de duración del análisis, pero entraría en consideración el establecer el estado pupilar al momento de la toma de la fotografía para evitar diferencias propias al encontrar pacientes en midriasis o miosis. Estos son futuros aspectos a estudiar con mayor profundidad.

Prosiguiendo, se observó que cuando se analizaba estadísticamente la evolución de la NVCs en los pacientes afectados con SIL que fueron tratados y seguidos a lo largo de un año, si había diferencias significativas cuando se utilizaba el nuevo método propuesto, entre la visita inicial y los 6 meses inmediatos a la intervención terapéutica. Por el contrario, esta diferencia no fue significativa entre la visita inicial y el desenlace final a los 12 meses de seguimiento. Esto parece sugerir que en los pacientes de la muestra que utilizamos, los cambios de mayor magnitud a causa del tratamiento se dan en los primeros seis meses después del trasplante de células madres. Además, se ha visto que, en términos generales, las diferencias en la NVCs observadas por la escala de Efron, no tienen significancia estadística al ser medidas con el nuevo método propuesto, salvo al evaluar las diferencias entre la primera y la última visita, donde se observa la misma tendencia con la escala de Efron que cuando utilizamos el nuevo método de medida de la NVCs, aunque estas se queden al borde de la significación. Estos hallazgos no deberían ser una limitación para utilizar el nuevo método propuesto en lugar de la escala de Efron, ya que el nuevo método permite realizar medidas cuantitativas en una escala continua y medir de forma mucho más precisa la NVCs que cuando se utiliza la escala de Efron.

Limitaciones del trabajo

Un factor limitante de este trabajo fue que algunas de las fotografías con las que se contaban, no tenían las características más adecuadas, por problemas de resolución, no visualización del limbo en su totalidad por superposición de parpados y pestañas, iluminación inadecuada y reflejos luminosos muy grandes. Para reducir este problema. En futuras líneas de trabajo y en la práctica clínica, es necesario estandarizar la toma de dichas fotografías; para reducir las variables externas en cada foto que afecten la precisión de la medición y para reducir la

duración del análisis, puesto que estas fotografías suponen aún más esfuerzo a la hora de definir las áreas a marcar.

Otra de las limitaciones del trabajo se observó al intentar diferenciar la vascularización superficial de la profunda, ya que requiere de la aplicación de un criterio subjetivo, lo que aumenta la variabilidad de las mediciones. Para líneas futuras, se podría minimizar las diferencias a la hora de definir NVCs y profunda en las distintas mediciones teniendo un entrenamiento previo dirigido por profesionales expertos en el área, que puedan identificar en las fotografías características que ayuden a clasificar dichos vasos en los que se generan dudas. Así quizá sería más factible, mejorar la reproducibilidad del método. En este sentido incluso sería interesante el planteamiento realizado en su momento por Nathan Efron.²⁶ Este autor sugirió la creación de una ayuda audiovisual, haciendo la función de un programa de tutoría, en la que se ayuden a identificar estas diferencias, y que sea de libre acceso para aquel personal sanitario que no cuente con un tutor experto. Hay que tener en cuenta que cuando se está observando la córnea en la lámpara de hendidura, no sólo se hace en 3 dimensiones, sino que además se tiene la función “hendidura”, que permite localizar la profundidad de cualquier lesión, con lo cual la diferenciación entre un vaso profundo y uno superficial no suele plantear problemas. Quizá contando con esta información adicional en cada fotografía se logre determinar algún factor diferencial en la fotografía que oriente sobre la profundidad de los vasos. No obstante, no debería sacarse de consideración, la valoración NV corneal general, en conjunto, superficial y profunda, con el fin de mejorar la repetibilidad y la reproducibilidad del método.

Por último, una importante limitación a tener en cuenta para el tercer objetivo ha sido el que la muestra analizada en este trabajo es una serie de casos relativamente pequeña, por lo que para llegar a proponer afirmaciones concretas es necesario una muestra sensiblemente mayor. Estas cuestiones se deben desarrollar en líneas futuras, ya que la medida precisa de la NV corneal tiene gran relevancia en la práctica clínica y, sobre todo, en el contexto de ensayos clínicos donde este parámetro sea el signo clínico que se quiere

disminuir o eliminar, ayudando en la toma de decisiones sobre terapias, monitorización de la evolución y objetivar un pronóstico a largo plazo.

Conclusiones

1. El método propuesto para evaluar el área de NVCs es simple, rápido, preciso y accesible para la mayoría de los profesionales sanitarios.
2. El método propuesto es repetible y reproducible, por lo que es válido como metodología a estandarizar para cuantificar la NV corneal.
3. Un dato objetivo como es el porcentaje de área de NVCs, obtenido con este método, se puede clasificar por grados de severidad, reduciendo así la subjetividad en dichas clasificaciones.
4. El método tiene ventajas de precisión sobre la escala de Efron y sobre otras escalas cualitativas que han sido usadas para la valoración de la NVCs en la práctica clínica.
5. Trabajando en las limitaciones observadas, este nuevo método de evaluación de NV corneal representa una herramienta útil en la práctica clínica diaria y en las líneas de investigación, para evaluar la eficacia de las distintas terapias ya existentes y las que se encuentran en desarrollo.

Bibliografía

1. Benayoun Y, Casse G, Forte R, Dallaudière B, Adenis JP, Robert PY. Corneal Neovascularization: Epidemiological, Physiopathological, And Clinical Features. *J Fr Ophthalmol*. 2013;36:627–639. doi:10.1016/j.jfo.2013.03.002.
2. Stanzel TP, Devarajan K, Lwin NC, Yam GH, Schmetterer L, Mehta JS, Ang M. Comparison Of Optical Coherence Tomography Angiography To Indocyanine Green Angiography And Slit Lamp Photography For Corneal Vascularization In An Animal Model. *Sci Rep*. 2018;8: 11493. doi:10.1038/s41598-018-29752-5.
3. Faraj LA, Said DG, Al-Aqaba M, Otri AM, Dua HS. Clinical Evaluation And Characterisation Of Corneal Vascularisation. *Br J Ophthalmol*. 2016;100:315–322. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-306686.
4. Mohammadpour M, Jabbarvand M, Hashemi H, Delrish E. Prophylactic Effect Of Topical Silica Nanoparticles As A Novel Antineovascularization Agent For Inhibiting Corneal Neovascularization Following Chemical Burn. *Adv Biomed Res*. 2015;4:124. doi:10.4103/2277-9175.158039.
5. Yazdanpanah G, Jabbehdari S, Djalilian AR. Limbal And Corneal Epithelial Homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2017;28:348–354. doi:10.1097/ICU.0000000000000378.
6. López-Paniagua M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Dziasko M, Galindo S, Rey E, Herreras JM, Corrales RM, Daniels JT, Calonge M. Comparison Of Functional Limbal Epithelial Stem Cell Isolation Methods. *Exp Eye Res*. 2016;146:83–94. doi:10.1016/j.exer.2015.12.002.
7. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal Stem-Cell Therapy And Long-Term Corneal Regeneration. *N Engl J Med*. 2010;363:147–155. doi:10.1056/NEJMoa0905955.
8. Zakaria N, Possemiers T, Dhubhghaill SN, Leysen I, Rozema J, Koppen C, Timmermans JP, Berneman Z, Tassignon MJ. Results Of A Phase I/II Clinical Trial: Standardized, Non-Xenogenic, Cultivated Limbal Stem Cell Transplantation. *J Transl Med*. 2014;12:58. doi:10.1186/1479-5876-12-58

9. Kolli SAI, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful Clinical Implementation Of Corneal Epithelial Stem Cell Therapy For Treatment Of Unilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *Stem Cells*. 2010;28:597–610. doi:10.1002/stem.276.
10. Ramírez BE, Sánchez A, Herreras JM, Fernández I, García-Sancho J, Nieto-Miguel T, Calonge M. Stem Cell Therapy For Corneal Epithelium Regeneration Following Good Manufacturing And Clinical Procedures. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 408495. doi:10.1155/2015/408495.
11. Calonge M, Pérez I, Galindo S, Nieto-Miguel T, López-Paniagua M, Fernández I, Alberca M, García-Sancho J, Sánchez A, Herreras JM. A Proof-Of-Concept Clinical Trial Using Mesenchymal Stem Cells For The Treatment Of Corneal Epithelial Stem Cell Deficiency. *Transl Res*. 2019;206:18-40. doi:10.1016/j.trsl.2018.11.003.
12. Pedrotti E, Passilongo M, Fasolo A, Nubile M, Parisi G, Mastropasqua R, Ficial S, Bertolin M, Di Iorio E, Ponzin D, Marchini G. In Vivo Confocal Microscopy 1 Year After Autologous Cultured Limbal Stem Cell Grafts. *Ophthalmology*. 2015;122:1660–1668. doi:10.1016/j.ophtha.2015.04.004.
13. Oie Y, Nishida K. Evaluation Of Corneal Neovascularization Using Optical Coherence Tomography Angiography In Patients With Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*. 2017;36:S72–S75. doi:10.1097/ICO.0000000000001382.
14. Zakaria N, van Grasdorff S, Wouters K, Rozema J, Koppen C, Lion E, Cools N, Berneman Z, Tassignon MJ. Human Tears Reveal Insights Into Corneal Neovascularization. *PLoS One*. 2012;7:3–10. doi:10.1371/journal.pone.0036451
15. Dastjerdi MH, Al-Arfaj KM, Nallasamy N, Hamrah P, Jurkunas U V., Pineda R, Pavan-Langston D, Dana R. Topical Bevacizumab In The Treatment Of Corneal Neovascularization; Results Of A Prospective, Open-Label, Noncomparative Study. *Arch Ophthalmol*. 2009;127:381–389. doi:10.1001/archophthalmol.2009.18.
16. Binotto TE, Andrade AL, Costa TA, Plepis AM, Lopes RA, Souza WM. Clinical Evaluation And Induced Corneal Vascularization Study By Native And Anionic Collagen Membranes In Rabbits Corneas. *Arq Bras Oftalmol*. 2009;72:760–765. doi: 10.1590/S0004-27492009000600004.

17. Bock F, König Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab (Avastin) Eye Drops Inhibit Corneal Neovascularization. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246:281–284. doi:10.1007/s00417-007-0684-4.
18. Barros LEM, Belfort R. The Effects Of The Subconjunctival Injection Of Bevacizumab (Avastin®) On Angiogenesis In The Rat Cornea. *An Acad Bras Cienc*. 2007;79:389–394. doi:S0001-37652007000300004.
19. Tatham A, Tatham E, Prydal J. Validation Of A Semi-Automated Computer-Aided Technique For Quantifying Corneal Vascularisation And Scarring. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:1379–1384. doi:10.1136/bjophthalmol-2011-300638
20. Kim J-H, Seo H-W, Han H-C, Lee J-H, Choi S-K, Lee D. The Effect Of Bevacizumab Versus Ranibizumab In The Treatment Of Corneal Neovascularization: A Preliminary Study. *Korean J Ophthalmol*. 2013;27:235–242. doi:10.3341/kjo.2013.27.4.235.
21. Ribeiro JCML, Vagnaldo Fchine F, Ribeiro MZML, Barreiro EJ, Moreira Lima L, Ricardo NMPS, Amaral De Moraes ME, Odorico De Moraes M. Potential Inhibitory Effect Of Lassbio-596, A New Thalidomide Hybrid, On Inflammatory Corneal Angiogenesis In Rabbits. *Ophthalmic Res*. 2012;48:177–185. doi:10.1159/000337137.
22. Deng SX, Borderie V, Chan CC, Dana R, Figueiredo FC, Gomes JAP, Pellegrini G, Shimmura S, Kruse FE; and The International Limbal Stem Cell Deficiency Working Group. Global Consensus On Definition, Classification, Diagnosis, And Staging Of Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*. 2019;38:364-375. doi:10.1097/ICO.0000000000001820.
23. Palme C, Romano V, Brunner M, Vinciguerra R, Kaye SB, Steger B. Functional Staging Of Corneal Neovascularization Using Fluorescein And Indocyanine Green Angiography. *Transl Vis Sci Technol*. 2018;7:15. doi:10.1167/tvst.7.5.15.
24. Claros-Chacaltana FDY, Kobashigawa KK, Padua IRM, Valdetaro GP, Aldrovani M, Laus JL. Corneal Angiogenesis Based On Different Protocols Of Alkaline Cauterization In Murine Models. *Acta Cir Bras*. 2017;32:607–616. doi:10.1590/s0102-865020170080000002

25. Sotozono C, Ang LPK, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, Kaido M, Dogru M, Shimazaki J, Tsubota K, Yamada M, Kinoshita S. New Grading System For The Evaluation Of Chronic Ocular Manifestations In Patients With Stevens-Johnson Syndrome. *Ophthalmology*. 2007;114:1294–1302. doi:10.1016/j.ophtha.2006.10.029.
26. Efron N, Morgan PB, Katsara SS. Validation Of Grading Scales For Contact Lens Complications. *Ophthal Physiol Opt*. 2001;21:17-29. doi: 10.1046/j.1475-1313.1999.00420.x-i1.
27. Frucht J, Zauberman H. Topical Indomethacin Effect On Neovascularisation Of The Cornea And On Prostaglandin E2 Levels. *Br J Ophthalmol*. 1984;68:656–659. doi:10.1136/bjo.68.9.656.
28. Efron N. Grading Scales For Contact Lens Complications. *Ophthalmic Physiol Opt*. 1998;18:182–186. doi:10.1016/S0275-5408(97)00066-5.
29. Bergmanson JP, Martinez JG. Size Does Matter: What Is The Corneo-Limbal Diameter?. *Clin Exp Optom*. 2017; 100: 522-528. doi: 10.1111/cxo.12583.
30. Portney LG, Watkins MP. *Foundations Of Clinical Research: Applications To Practice*. Prentice Hall Inc. New Jersey. 2000; 560-567. ISBN 0-8385-2695-0

Anexo 1

QUT Digital Repository:
<http://eprints.qut.edu.au>

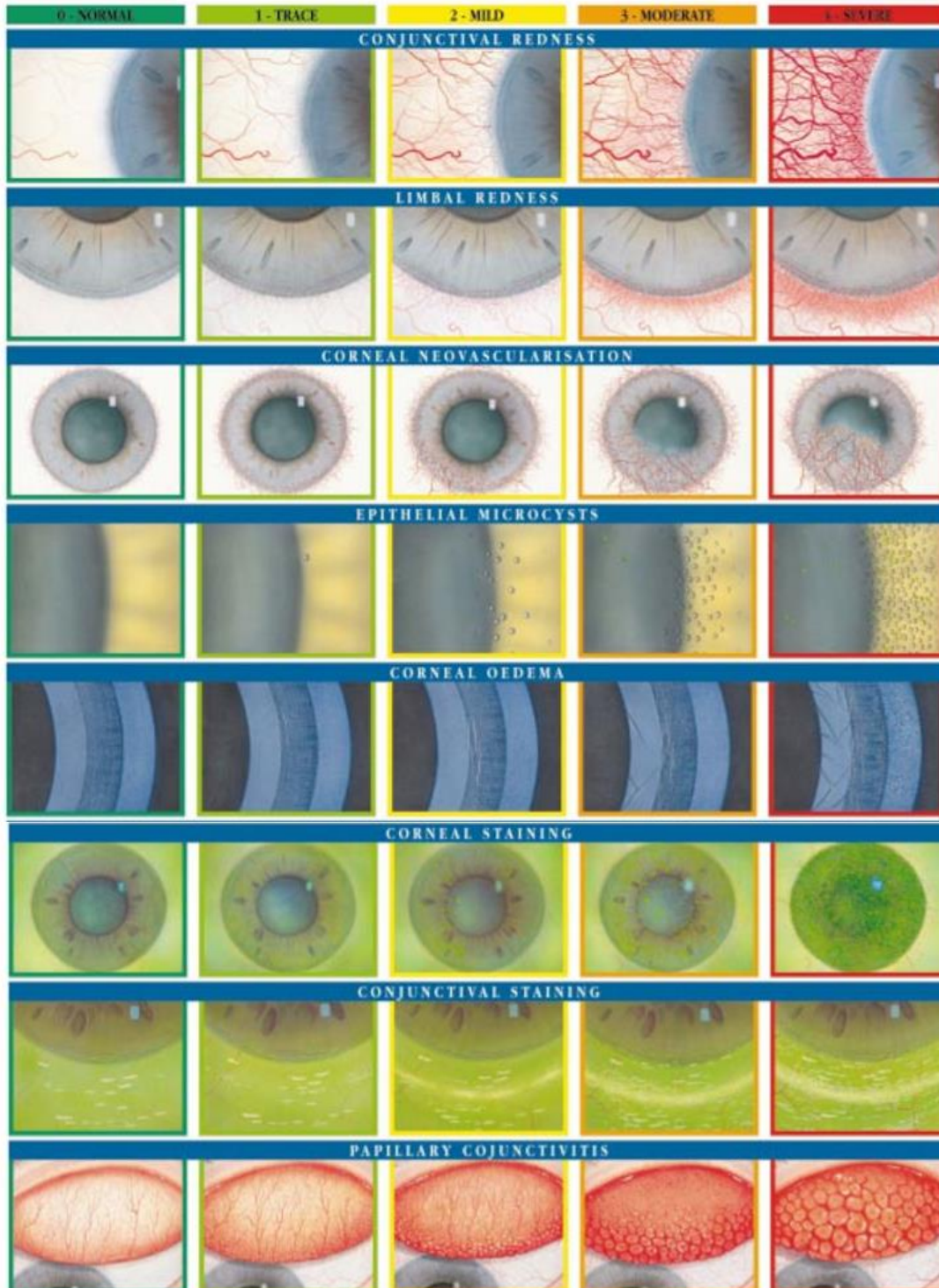


Efron, Nathan (2000) Efron Grading Scales for Contact Lens Complications (Millennium Edition), Butterworth-Heinemann.

© Copyright 2000 Nathan Efron/Butterworth-Heinemann

The Efron Grading Scales provide a standard clinical reference for describing the severity of contact lens complications. Professor Nathan Efron, international lecturer in the field of the ocular response to contact lens wear and author of over 500 scientific works, developed the unique scales. They provide practitioners with a simple method of ocular condition grading, against which any future tissue change may be assessed and therefore enabling choices as to the best course of action. The 16 sets of grading images cover the key anterior ocular complications of contact lens wear. The conditions are illustrated in five stages of increasing severity from 0 to 4, with 'traffic light' colour banding from green (normal) to red (severe) - providing a simple and convenient aid for the optical professional.

Efron Grading Scales for Contact Lens Complications



Devised by Professor Nathan Efron and illustrated by Terry R Tarrant. Millennium Edition. January 1, 2000
 Supplement to the book Contact Lens Complications, 2nd edition by Nathan Efron
 published by Butterworth-Heinemann, 2004, ISBN 0 7506 5534 8

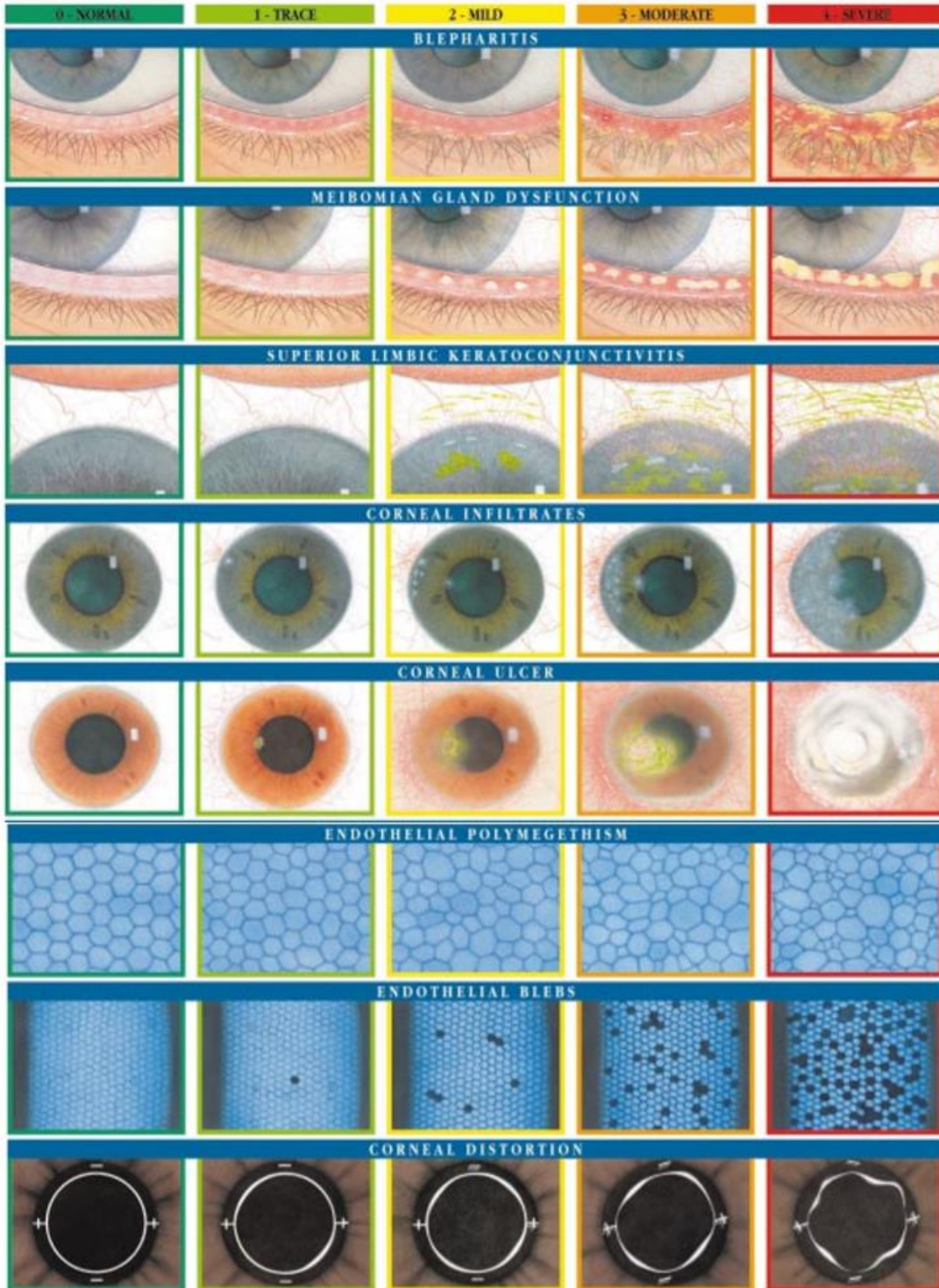
VC EFRONGS

Sponsored by

Bausch & Lomb

Perfecting Vision. Enhancing Life.™

Efron Grading Scales for Contact Lens Complications



Devised by Professor Nathan Efron and illustrated by Terry R Tarrant. Millennium Edition. January 1, 2000
 Supplement to the book Contact Lens Complications, 2nd edition by Nathan Efron
 published by Butterworth-Heinemann, 2004, ISBN 0 7506 5534 8

VC-EFRONGS

Sponsored by

Bausch & Lomb

Perfecting Vision. Enhancing Life.™

Anexo 3

Area de NVCs (%)			
Imagen	Observado 1 1er tiempo	Observador 1 2do tiempo	Observador 2
1	7,65	7,81	7,39
2	16,05	31,35	18,70
3	40,51	34,68	50,26
4	68,74	63,85	86,01
5	87,73	87,72	92,88
6	34,89	59,69	85,69
7	92,32	90,00	83,31
8	96,74	90,46	94,12
9	11,78	5,98	2,28
10	31,20	40,53	48,60
11	51,45	66,92	64,27
12	53,54	44,72	69,15
13	19,17	15,97	25,45
14	44,23	34,68	33,95
15	11,73	15,02	34,96
16	10,57	17,44	40,79
17	63,91	55,97	64,19
18	41,00	25,48	42,11
19	98,19	98,38	100,00
20	2,02	1,86	21,66
21	72,77	73,77	52,75
22	42,05	34,42	33,13
23	45,69	43,56	41,68
24	14,78	19,05	22,68
25	10,04	14,02	13,47
26	64,13	63,75	66,50
27	20,77	22,12	25,81
28	9,24	3,64	10,87
29	62,62	62,17	69,14
30	69,19	66,61	69,89
31	63,37	62,38	66,93
32	76,75	63,01	58,25
33	44,19	28,71	43,90
34	20,92	34,87	44,01
35	4,06	4,51	7,58
36	86,17	87,36	89,33
37	97,33	94,46	91,33
38	24,31	17,03	31,61
39	23,07	14,92	9,60
40	98,94	96,96	91,41

Anexo 4

Evaluación por el nuevo método propuesto y por Escala de Efron		
Imagen	Area de NVCs (%)	Escala de Efron
1	7,39	2
2	18,70	1
3	50,26	2
4	86,01	3
5	92,88	4
6	85,69	2
7	83,31	3
8	94,12	2
9	2,28	1
10	48,60	3
11	64,27	3
12	69,15	3
13	25,45	1
14	33,95	1
15	34,96	2
16	40,79	2
17	64,19	2
18	42,11	NO
19	100,00	4
20	21,66	1
21	52,75	3
22	33,13	2
23	41,68	2
24	22,68	1
25	13,47	1
26	66,50	3
27	25,81	2
28	10,87	2
29	69,14	2
30	69,89	3
31	66,93	3
32	58,25	3
33	43,90	2
34	44,01	2
35	7,58	2
36	89,33	3
37	91,33	3
38	31,61	2
39	9,60	2
40	91,41	4

Anexo 5

Seguimiento en el tiempo por Escala de Efron y por el nuevo método propuesto						
Imagen	Efron			Area de NVCs (%)		
	0	6	12	0	6	12
1	2	1	1	7,81	0,75	9,02
2	2	1	1	10,50	19,37	31,35
3	3	2	1	36,06	34,68	21,39
4	2	2	3	28,71	34,87	63,85
5	4	3	2	40,62	51,32	59,69
6	3	2	2	90,00	90,46	45,86
7	1	1	1	11,12	5,98	8,83
8	3	3	3	66,92	63,01	63,00
9	3	2	1	52,12	17,03	34,68
10	4	4	4	98,38	100,00	100,00
11	4	4	4	98,94	95,71	97,96
12	3	2	2	72,77	49,36	45,77
13	2	2	2	42,05	17,76	45,69
14	2	1	1	20,60	14,78	20,29
15	1	1	1	9,23	10,04	9,12
16	3	2	1	64,13	21,48	32,61
17	2	1	1	20,77	6,20	7,10
18	2	1	1	9,24	10,30	6,66
19	3	3	2	69,19	63,37	62,62
20	2	1	1	10,80	2,02	1,74