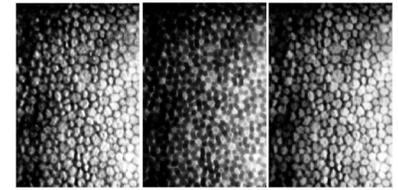


Procesado automático de imagen aplicado al conteo y caracterización de la forma de células endoteliales corneales



Automatic image processing applied to corneal endothelium cell count and shape characterization



José Velázquez-Blázquez¹, Francisco Cavas¹, Víctor Campuzano¹, Jorge Alió-del-Barrio^{2,3}, Francisco Fernández-Cañavate¹ y Jorge Alió^{2,3}

¹ Universidad Politécnica de Cartagena. Dpto. de Estructuras, Construcción y Expresión Gráfica. Campus Muralla del Mar. C/ Doctor Fleming, s/n - 30202 Cartagena (España)

² Unidad de Queratocono. Visum. C/ Cabañal, 1 - 03016 Alicante (España)

³ Universidad Miguel Hernández de Elche. Departamento de Oftalmología. Avenida Joan Carles I, 2- 03203 Elche, Alicante (España)

DOI: <http://dx.doi.org/10.6036/9275> | Recibido: 31/05/2019 • Inicio Evaluación: 04/06/2019 • Aceptado: 20/09/2019

ABSTRACT

- Corneal endothelium cell count, as well as cell hexagonality percent characterization, are of great importance nowadays to detect anomalies and pathologies of human eye, such as glaucoma. Prevalent technologies used are mainly based in both microscopy and a later image analysis. However, automatic cell count made by microscopes' built-in software is rather inconsistent, therefore many laboratories opt for using manual count as the most reliable alternative. This count is a tedious and time-consuming task, that can lead to human error, for this reason, several proposals to automate the process have been made. Present communication shows a procedure for the automatic pre-processing, segmentation and analysis of the images obtained by a confocal microscope, using watershed transform, and the graphics user interface (GUI) created with Matlab® to apply this procedure. In order to quantify the procedure's quality, 30 corneal endothelium images with a number of cells between 90 and 170 were analysed, resulting in a mean error in cell count of 4.3%, which can be considered a reasonably good result. However, results achieved for hexagonality percent using this method, and with the available image quality, are not as good as expected, which invites to improving image quality, focusing in areas with better cell homogeneity or even considering the application of other algorithms, such as neural networks, for future works.
- **Keywords:** Graphics User Interface (GUI), Hexagonality, Watershed, Opening-Closing by reconstruction (OCBR).

RESUMEN

El conteo de células del endotelio corneal, así como la caracterización de su porcentaje de hexagonalidad, cuentan con gran importancia en la actualidad para la detección de anomalías y patologías del ojo humano, tales como el glaucoma. Las tecnologías más usadas actualmente se basan tanto en la microscopía como en un posterior análisis de imagen. Sin embargo, el conteo automático de células realizado por el software integrado en el propio microscopio es bastante inconsistente, por lo que muchos laboratorios optan por usar el conteo manual como alternativa más fiable. Este conteo manual es una tarea ardua y tediosa, que puede dar lugar a errores humanos, por lo que se han realizado diversas propuestas para automatizar el proceso. Esta comunicación presenta un procedimiento para el pre-procesado, segmentación y análisis automático de las imágenes obtenidas por el micros-

copio confocal, mediante la transformada watershed y el interfaz gráfico de usuario (GUI) creado con Matlab® a tal efecto. A fin de cuantificar la calidad del proceso, se analizaron 30 imágenes del endotelio corneal con un número de células de entre 90 y 170, resultando en un error medio en el conteo del 4.3%, lo que puede considerarse un resultado razonablemente bueno. Sin embargo, los resultados logrados para el porcentaje de hexagonalidad mediante este método no fueron tan buenos como se esperaba, lo que invita a mejorar la calidad de imagen, centrándose en áreas con una mayor homogeneidad celular, o incluso a considerar la aplicación de otros algoritmos, tales como las redes neuronales, para futuros trabajos.

Palabras clave: Matlab®, Interfaz Gráfica de Usuario (GUI), Hexagonalidad, Watershed, Opening-Closing by reconstruction (OCBR).

1. INTRODUCCIÓN

La cornea es un tejido conectivo transparente y avascular compuesto de cinco capas diferenciadas, tres celulares (epitelio, estroma y endotelio) y dos interfases (la membrana de Bowman y la membrana de Descemet) [1].

De entre ellas, el endotelio es la capa responsable de mantener una hidratación constante (y por tanto la transparencia), presentando en su forma no degradada un aspecto de mosaico hexagonal que recuerda a un panal de abejas [2]. Por el proceso natural de envejecimiento, así como por ciertas patologías o disfunciones, tanto el número de celdas como su forma van cambiando a lo largo de la vida, de 3000/4000 células/cm² en la segunda década de vida hasta unas 2600 células/cm² al sobrepasar la octava. El número de celdas con forma hexagonal se modifica de forma similar, desde aproximadamente el 75% hasta solo el 60% del total [1,3].

Esta reducción del número de celdas crea huecos que fuerzan al resto de células a aumentar su tamaño (polimegatismo) y/o perder su forma hexagonal (pleomorfismo) para rellenarlos [1,4], de ahí la gran importancia del conteo de células y la caracterización de su forma para detectar algunas anomalías.

Las técnicas de procesado de imagen, así como las usadas en modelado geométrico, son de uso común en el campo de la oftalmología para la caracterización de las distintas estructuras y tejidos corneales. Todas ellas ayudan a detectar, diagnosticar, controlar y tratar distintas patologías, tales como retinopatías, glaucoma

o queratocono, así como a caracterizar sus distintos grados [5-14].

Actualmente, existen numerosas técnicas para el análisis de las células endoteliales corneales, como los basados en la microscopía especular y la microscopía confocal. Estas son las técnicas más usadas, sobre todo por su bajo riesgo de generar lesiones epiteliales o infecciones (no existe contacto con el ojo) y la facilidad de uso de sus softwares [15-18].

Sin embargo, muchos autores destacan la inconsistencia del conteo automático de células realizado por el software propio de estos microscopios [4,16,17,19-21]. Por esta razón, muchos laboratorios y clínicas optan por usar el conteo de células manual como alternativa más confiable.

El conteo manual es una tarea ardua y tediosa que puede generar errores humanos. Por esta razón, se han desarrollado diversas propuestas de automatización del proceso de conteo y caracterización de la forma y tamaño de las células epiteliales. Todas ellas se basan en pre-procesar la imagen obtenida del microscopio, pero cada una lo hace con un enfoque distinto: aprendizaje automático no supervisado [4], algoritmos genéticos [19], optimización por serpiente o nubes de partículas [22] o redes neuronales [21,23], entre muchos otros, aunque cabe destacar que cada una tiene sus inconvenientes.

El presente artículo muestra un procedimiento para el pre-procesado, segmentación y análisis automático de imágenes obtenidas por microscopio confocal. Para aplicarlo, se ha usado la transformada Watershed, y una interfaz gráfica de usuario (GUI) creada con Matlab®, que componen conjuntamente una forma más cómoda y eficiente de contar las células endoteliales, así como de medir su porcentaje de hexagonalidad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PARTICIPANTES

Se usaron para este estudio un total de 30 imágenes de ojos de 30 pacientes (11 hombres / 19 mujeres, con edades comprendidas entre los 21 y los 52 años). Estas imágenes se seleccionaron aleatoriamente de la base de datos de fotos de endotelios de pacientes tomadas con un Konan NSP-9900 (Konan Medical, Hyogo, Japón) en la clínica Vissum (un centro asociado con la Universidad Miguel Hernández de Alicante, España). Las fotos fueron tomadas por un técnico experto, siguiendo los estándares éticos marcados por la Declaración de Helsinki (séptima edición, octubre 2013, Fortaleza, Brasil) y contando con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica local, y el consentimiento informado de los pacientes.

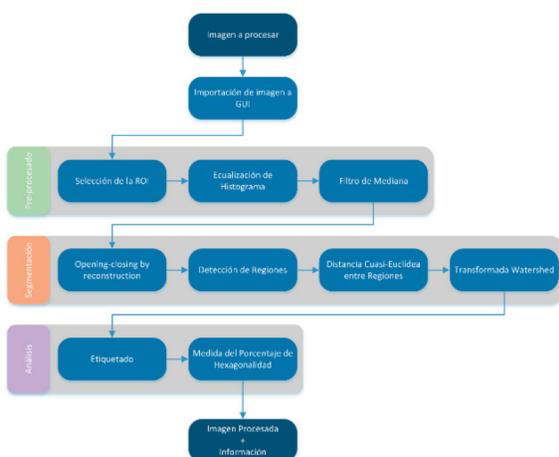


Fig. 1: Diagrama de flujo del procedimiento

2.2. SOFTWARE

El entorno de programación para los algoritmos de filtrado de imagen y detección de células, así como para la creación de la GUI, fue el software comercial Matlab® R2017b (MathWorks®, Natick, EEUU). Matlab® es una poderosa herramienta para el tratamiento de imágenes, ya que puede descomponerlas y tratarlas como matrices. El diagrama de flujo del proceso puede observarse en la Fig. 1.

El microscopio confocal Konan NSP-9900 usa su propio software (CellCheck®) para obtener imágenes del endotelio, permitiendo su exportación en múltiples formatos, habiéndose elegido el estándar .JPG para la importación a la GUI diseñada.

2.3. PRE-PROCESADO

Región de Interés (ROI). Tras seleccionar la imagen, el primer paso consiste en seleccionar una ROI dentro de la cual el proceso tendrá lugar. Para ello, se usa la función *roipoly* de la librería de Matlab®, permitiendo la creación de una ROI poligonal y obteniendo una máscara de filtrado. A continuación, se obtiene el complementario de la máscara con la función *imcomplement*, se transforma a formato escala de grises (uint8) usando *im2uint8*, y finalmente, el polígono transformado en máscara en escala de grises es añadido a la imagen original, pixel a pixel, por saturación, con *imadd*.

Ecuilización de Histograma. Para distinguir mejor las regiones interiores de las celdas de sus bordes, el método elegido fue la ecualización y expansión automática del histograma, que se realiza en Matlab® con la función *histeq*.

Filtro de Mediana. Para eliminar el ruido y suavizar los detalles, se consideraron distintos filtros tales como el de Media, de Gauss o Binomial, optándose finalmente por aplicar el filtro de Mediana mediante la función de Matlab® *medfilt2*.

2.4. SEGMENTACIÓN

Para lograr una segmentación exitosa de las imágenes usando la transformada Watershed, es necesario que previamente se den varios pasos que permitan establecer marcas (masas de píxeles conectados) en los objetos.

Opening-Closing by reconstruction. De la gran variedad de procedimientos que se pueden usar para "limpiar" la imagen, se seleccionó la técnica morfológica conocida como Opening-Closing by reconstruction (OCBR). Esta operación crea regiones de intensidad máxima dentro de cada objeto, de modo que puedan ser detectadas posteriormente. El procedimiento seguido para realizar esta técnica se apoya en las siguientes funciones de Matlab®:

1. Erosión de la imagen con *imerode* y un kernel con forma de disco previamente definido con *strel*.
2. Reconstrucción de la imagen erosionada con *imreconstruct*.
3. Dilatación de la imagen con *imdilate* y un operador de convolución con forma de disco como el del paso 1, creado con *strel*.
4. Reconstrucción de la imagen dilatada con *imreconstruct*.
5. Complementación del resultado con *imcomplement*.
6. Segundo filtrado por Mediana y erosión de bordes para remarcarlos y separar las regiones que todavía quedan unidas.

Detección de Regiones. Para detectar las regiones interiores de las células se usó la función *imregionalmax*, detectando grupos de 4 píxeles vecinos conectados cuya intensidad fuera máxima.

Para eliminar los grupos de píxeles pequeños restantes, se aplicó la función *bwareaopen*. Finalmente, para asemejar las regiones de máxima intensidad a las regiones interiores de las células, se llevó a cabo un cierre morfológico de la imagen binaria con la función *imclose*, mediante un operador de convolución con forma de disco y radio de 3 píxeles.

Transformada Watershed. Para obtener la distancia entre objetos necesaria para aplicar la transformada Watershed, se usó la función *bwdist* con distancia Cuasi-Euclídea, forzando por tanto a que la forma de las células tendiera a un hexágono, en lugar de a una circunferencia. A continuación, se hizo la transformada Watershed mediante la función *watershed*, seleccionando solamente los valores más altos del resultado (`image == 0`).

2.5. ANÁLISIS: NÚMERO DE CÉLULAS Y HEXAGONALIDAD

El principal objetivo de este estudio es obtener el número de células en una imagen del endotelio corneal, así como su porcentaje de hexagonalidad, ya que estas características son usadas para el diagnóstico de enfermedades corneales. Para ello, se han usado los siguientes métodos:

Etiquetado. Para obtener el valor de la densidad celular, el método de etiquetado se aplicó mediante la función de Matlab® *bwlabel*, que devuelve el número de objetos etiquetados en la imagen.

Porcentaje de Hexagonalidad. Para obtener el porcentaje de hexagonalidad, se optó por un enfoque matemático, definiendo la hexagonalidad como la cercanía de la $\text{ratio } \text{área}/\text{perímetro}^2$ a la de un hexágono regular en cada célula. Esta constante de los polígonos regulares es independiente del tamaño y para un hexágono regular toma el valor 0.07216875. Para su cálculo, se utilizó la función *regionprops* a fin de adquirir el área y el perímetro de todos los objetos previamente etiquetados. Una vez calculada la constante de cada célula, el error cuando se compara con la constante del hexágono perfecto se obtiene por medio de un código de desarrollo propio. Por tanto, este error expresa el porcentaje de hexagonalidad para cada célula, y se muestra finalmente en la GUI en forma de histograma, junto con el valor medio de porcentaje de hexagonalidad de todas las células, como se puede observar en la sección de Material Suplementario (Fig. 1).

2.6. INTERFAZ GRÁFICA DE USUARIO

Para obtener un diseño legible e intuitivo, la paleta de colores se homogeneizó a blanco, y toda la GUI se estructuró colocando cada objeto de forma equidistante y simplificando los botones y/o opciones, así como la información mostrada. La GUI diseñada permite la apertura de una imagen, mostrar su histograma, detectar las células y calcular el número de ellas y su porcentaje de hexagonalidad, tanto de forma individual como en forma de valor medio. La Fig. 1 de la sección de Material Suplementario muestra el diseño final de la GUI creada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que en cada caso es indispensable la adquisición de una ROI de la imagen, ya que suelen existir habitualmente diferencias de contraste, regiones en las que las células no son homogéneas o en las que sus bordes se mezclan, entre otras imperfecciones. El resultado de la selección de la ROI y la imagen original pueden verse en la sección de Material Suplementario (Fig. 2).

Con el fin de mejorar el contraste de la imagen, en una etapa inicial se probaron filtros de ajuste de brillo y de mejora lineal de bordes, con resultados no muy satisfactorios ya que existe un gran contraste entre las zonas oscuras adyacentes a zonas muy claras. Para hacer que el programa funcione con la mayoría de imágenes, ha sido necesario ecualizar el histograma para mejorar el contraste entre las zonas interiores de las células y sus bordes. Los resultados pueden verse en la sección de Material Suplementario (Figs. 3 y 4).

Dado que el ruido presente en las imágenes suele estar causado por la presencia aleatoria de píxeles totalmente blancos, la aplicación del filtro de mediana reduce la cantidad de variaciones de intensidad entre píxeles vecinos, e incluso elimina aquellos cuyo nivel de intensidad es muy diferente, consiguiendo un suavizado de la imagen sin eliminar detalles importantes, tales como los bordes, como puede observarse en la sección de Material Suplementario (Fig. 5).

El método de segmentación OCBR se ha comprobado crítico para la obtención del número de células endoteliales corneales, ya que homogeniza casi en su totalidad la región interior de ellas. El resultado, paso a paso, de la operación morfológica de Opening-Closing by Reconstruction puede comprobarse en las Figs. 2 y 3.

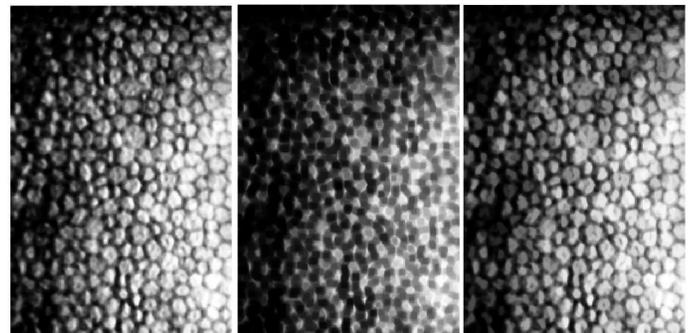


Fig. 2: Imagen antes de erosionar (izq.), tras erosionar (centro) y tras reconstrucción (drcha.)

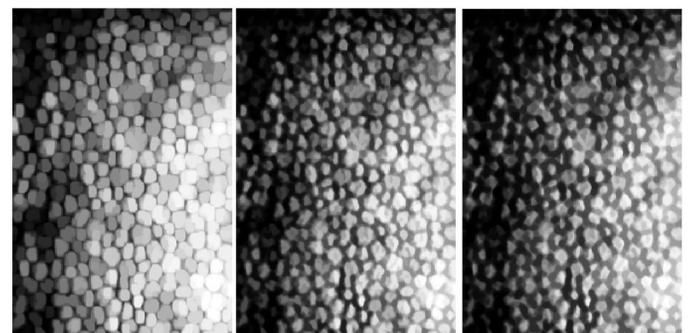


Fig. 3: Imagen tras dilatación (izq.), tras 2ª reconstrucción y complementación (centro) y final, tras 2º filtro de mediana (drcha.)

El método para la detección de las regiones máximas funciona correctamente, aunque sus resultados dependen en gran manera de la segmentación previa y de la calidad de la imagen original. Los resultados de las operaciones *imregionalmax*, *bwareaopen* y *imclose* se muestran en la Fig. 4.

Aunque muchos otros algoritmos de detección de bordes se ensayaron, tales como "sobel", "prewitt" o "canny", se optó finalmente por usar la transformada Watershed con distancia Cuasi-Euclídea, ya que proporciona resultados que recuerdan mucho a una forma hexagonal, que es la forma ideal de las células endoteliales corneales.

El método de etiquetado contó siempre la totalidad de células previamente detectadas por la segmentación, por lo que el error

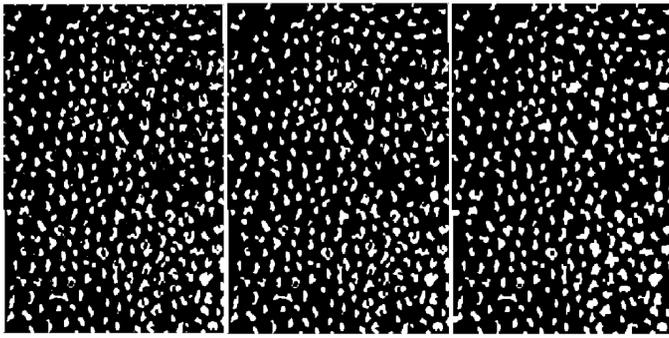


Fig. 4: Imagen tras aplicar imregionalmax (izq.), bwareaopen (centro) y imclose (drcha.)

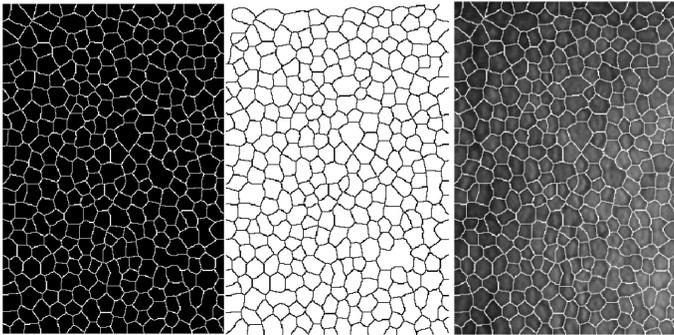


Fig. 5: Resultado de la transformada Watershed (izq.), su imagen complementaria (centro) y su superposición sobre la imagen original (drcha.)

se reduce a aquel producido por la segmentación en sí misma. En este caso, la imagen usada para el conteo de células es la complementaria del resultado de la transformada Watershed (Fig. 5), ya que la función usa las regiones etiquetadas de imagen binaria cuyo valor de pixel es igual a 1.

Para cuantificar la calidad de la segmentación realizada, se analizaron 30 imágenes con los algoritmos programados, con un número de células en la ROI de entre 90 y 170. (Fig. 6). Para estimar el error cometido durante el conteo, se consideró la medida manual como el valor exacto, y a continuación se contabilizó la desviación respecto a ella con el conteo automático, con la siguiente ecuación:

$$E_i = \frac{C_a \cdot 100}{C_m} \quad (1)$$

Donde E_i es el error en cada medida, C_m es el total de células medidas manualmente, y C_a es el total de células medidas de forma automática.

Tras contar las células endoteliales tanto manual como automáticamente, el error medio obtenido entre ambos procedimientos

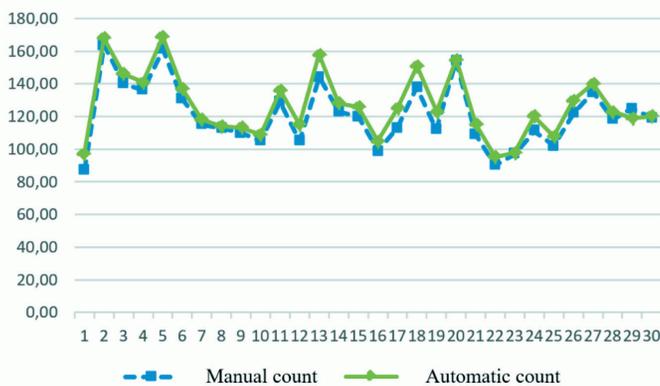


Fig. 6: Número de células contadas en modo automático vs. modo manual

tos fue del 4.3 % (desviación estándar: ± 2.9 %), que puede considerarse un resultado razonablemente bueno (Fig. 7). Los casos en los que el error fue superior al 10% correspondieron siempre a casos en los que la calidad de imagen era mala y/o existía alta variabilidad en el tamaño/forma de las células.

Para determinar el error medido en el porcentaje de hexagonalidad, procedimos de forma similar, considerando la medida manual como referencia, y comparándola con la automática:

$$H_i = \frac{P_a \cdot 100}{P_m} \quad (2)$$

Donde H_i es el error en la hexagonalidad en cada medida, P_m es el porcentaje de hexagonalidad medido manualmente y P_a es el porcentaje de hexagonalidad medido automáticamente. En este caso, el error medio obtenido fue superior al 16 % (desviación estándar: ± 8.8 %), por lo que es preciso un estudio posterior para su reducción (Fig. 8):

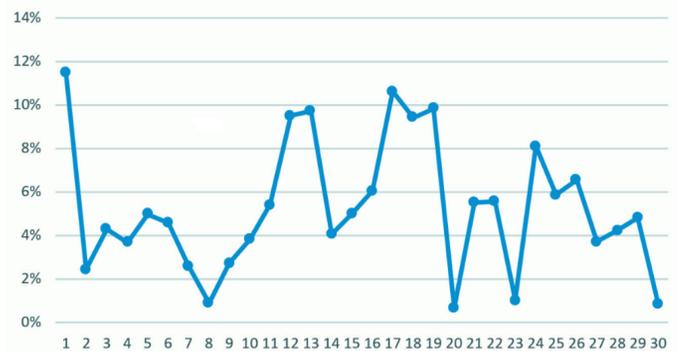


Fig. 7: Error de conteo de células en modo automático

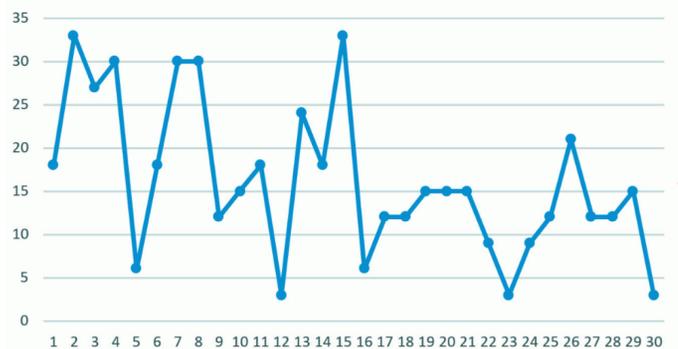


Fig. 8: Error de conteo de porcentaje de hexagonalidad en modo automático

4. CONCLUSIÓN

En este trabajo se han programado una serie de algoritmos con el software Matlab®, con objeto de obtener algunas de las principales características del endotelio corneal: densidad de células y porcentaje de hexagonalidad. Para facilitar la programación, se diseñó una GUI, programada también en Matlab®, para la importación de imágenes y visualización de los resultados de análisis.

Se ha logrado el objetivo de diseñar y programar tanto la GUI como varios algoritmos de detección de células que permiten la reducción del tiempo de análisis y evitan los errores humanos cuando se usa el software del microscopio confocal. Sin embargo, se ha detectado que la calidad y las características de las imágenes originales afectan considerablemente el nivel de error.

Los resultados obtenidos para el cálculo del número de células son satisfactorios, mostrando un error medio bajo, lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante otros enfoques: aprendizaje automático no supervisado [4], algoritmos genéticos [19] optimización por serpiente o nube de partículas [22] o redes neuronales [21,23]. Sin embargo, los resultados logrados para el porcentaje de hexagonalidad usando este método y con la calidad de las imágenes disponibles, no es tan bueno como cabría esperar, ya que el valor medio de las variaciones entre conteo manual y automático alcanza el 16%, por lo que precisa de futura investigación.

Los resultados obtenidos con este procedimiento pueden ser usados para analizar las características de la córnea de diversas enfermedades corneales, obteniéndose nuevos datos estadísticos representativos de las imágenes e incluso mejorando las imágenes obtenidas de otros tipos de células.

Para futuros trabajos, la calidad de las imágenes a analizar podría ser mejorada, así como podría homogeneizarse su tamaño, para lograr una total automatización del proceso. Además, el mismo método de segmentación debería seguir siendo evaluado con imágenes de mejor calidad, áreas con forma de células más homogénea, pudiendo también probarse nuevos algoritmos de programación, como las redes neuronales.

REFERENCIAS

- [1] DelMonte DW, Kim T (2011) Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 37 (3):588-598. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
- [2] Piorkowski A, Nurzynska K, Gronkowska-Serafin J, Selig B, Boldak C, Reska D (2017) Influence of applied corneal endothelium image segmentation techniques on the clinical parameters. *Computerized Medical Imaging and Graphics* 55:13-27. doi: <https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2016.07.010>
- [3] Contreras-Corona RG, Anaya-Pava EJ, Gallegos-Valencia AJ, Villarreal-Maiz JA (2014) Densidad y morfología de células del endotelio corneal en adultos jóvenes del norte de México. *Revista Mexicana de Oftalmología* 88 (3):99-103. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mexoft.2014.02.002>
- [4] Kiran Kumar K, Srinivasa G (2018) Corneal Endothelium cell segmentation and count using K-means and watershed algorithms. In: *Proceedings of 2018 2nd International Conference on Advances in Electronics, Computers and Communications, ICAECC 2018*, 2018. doi: <https://doi.org/10.1109/ICAECC.2018.8479526>
- [5] Nitschke C, Nakazawa A (2017) Corneal Imaging. In: *The Wiley Handbook of Human Computer Interaction Set*, vol 1. pp 445-514. doi: <https://doi.org/10.1002/9781118976005.ch21>
- [6] Ng EYK, Tan JH, Acharya UR, Suri JS (2012) Human eye imaging and modeling. *Human Eye Imaging and Modeling*. doi:10.1201/b12081
- [7] Cavas-Martínez F, Fernández-Pacheco DG, De La Cruz-Sánchez E, Nieto Martínez J, Fernández Cañavate FJ, Vega-Estrada A, Plaza-Puche AB, Alió JL (2014) Geometrical custom modeling of human cornea in vivo and its use for the diagnosis of corneal ectasia. *PLoS ONE* 9 (10). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110249>
- [8] Juanes JA, Ruisoto P, Prats-Galino A, Framiñán A, Riesco JM (2014) Computed anatomical modelling of the optic pathway and oculomotor system using magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroradiology* 41 (3):168-176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neurad.2013.06.005>
- [9] Ng EYK, Rajendra Acharya U, Rangayyan RM, Suri JS (2014) Ophthalmological imaging and applications. *Ophthalmological Imaging and Applications*. doi: <https://doi.org/10.1201/b17026>
- [10] Cavas-Martínez F, Fernández-Pacheco DG, Parras D, Cañavate FJF, Bataille L, Alió J (2018) Study and characterization of morphogeometric parameters to assist diagnosis of keratoconus. *BioMedical Engineering Online* 17. doi: <https://doi.org/10.1186/s12938-018-0564-7>
- [11] Cavas-Martínez F, Bataille L, Fernández-Pacheco DG, Cañavate FJF, Alió JL (2017) Keratoconus Detection Based on a New Corneal Volumetric Analysis. *Scientific Reports* 7 (1). doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16145-3>
- [12] Cavas-Martínez F, Fernández-Pacheco DG, Cañavate FJF, Velázquez-Blázquez JS, Bolarín JM, Alió JL (2018) Study of morpho-geometric variables to improve the diagnosis in Keratoconus with mild visual limitation. *Symmetry* 10 (8). doi: <https://doi.org/10.3390/sym10080306>
- [13] Cavas Martínez F, García Fernández-Pacheco D, Fernández Cañavate FJ, Velázquez Blázquez JS, Bolarín JM, Tiveron M, Alió JL (2019) Detección De Queratocono Temprano Mediante Modelado 3D Personalizado Y Análisis De Sus Parámetros Geométricos. *Dyna Ingeniería E Industria* 94 (1):175-181. doi: <https://doi.org/10.6036/8895>
- [14] Cavas Martínez F, Fernández Pacheco D, De La Cruz Sanchez E, Nieto Martínez J, Fernández Cañavate FJ, Alió J (2015) MODELADO VIRTUAL DE UNA ESTRUCTURA BIOLÓGICA: LA CORNEA HUMANA. *DYNA Ingeniería e Industria; Vol 90, No 6* (2015)
- [15] Huang J, Maram J, Tepelus TC, Sadda SR, Chopra V, Lee OL (2017) Comparison of Noncontact Specular and Confocal Microscopy for Evaluation of Corneal Endothelium. *Eye and Contact Lens*. doi: <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000362>
- [16] Szalai E, Németh G, Berta A, Módis L (2011) Evaluation of the corneal endothelium using noncontact and contact specular microscopy. *Cornea* 30 (5):567-570. doi: <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3182000807>
- [17] Huang J, Maram J, Tepelus TC, Modak C, Marion K, Sadda SR, Chopra V, Lee OL (2018) Comparison of manual & automated analysis methods for corneal endothelial cell density measurements by specular microscopy. *Journal of Optometry* 11 (3):182-191. doi: <https://doi.org/10.1016/j.optom.2017.06.001>
- [18] Karaca I, Yilmaz SG, Palamar M, Ates H (2018) Comparison of central corneal thickness and endothelial cell measurements by Scheimpflug camera system and two noncontact specular microscopes. *International Ophthalmology* 38 (4):1601-1609. doi: <https://doi.org/10.1007/s10792-017-0630-3>
- [19] Scarpa F, Ruggeri A (2016) Development of a reliable automated algorithm for the morphometric analysis of human corneal endothelium. *Cornea* 35 (9):1222-1228. doi: <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000908>
- [20] Maruoka S, Nakakura S, Matsuo N, Yoshitomi K, Katakami C, Tabuchi H, Chikama T, Kiuchi Y (2018) Comparison of semi-automated center-dot and fully automated endothelial cell analyses from specular microscopy images. *International Ophthalmology* 38 (6):2495-2507. doi: <https://doi.org/10.1007/s10792-017-0760-7>
- [21] Fabijańska A (2019) Automatic segmentation of corneal endothelial cells from microscopy images. *Biomedical Signal Processing and Control* 47:145-158. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2018.08.018>
- [22] Sharif MS, Qahwaji R, Shahamatnia E, Alzubaidi R, Ipson S, Brahma A (2015) An efficient intelligent analysis system for confocal corneal endothelium images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 122 (3):421-436. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2015.09.003>
- [23] Elbita A, Qahwaji R, Ipson S, Sharif MS, Ghanchi F (2014) Preparation of 2D sequences of corneal images for 3D model building. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 114 (2):194-205. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2014.01.009>

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS-RD16/0008/0012), financiado por el Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

MATERIAL SUPLEMENTARIO

https://www.revistadyna.com/documentos/pdfs/_adic/9275-1.pdf

