



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis Doctoral

**Estudios de escalada de dosis sobre los efectos del  
Cloruro de Benzalconio intracameral en conejos:  
UN MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD ENDOTELIAL CORNEAL**

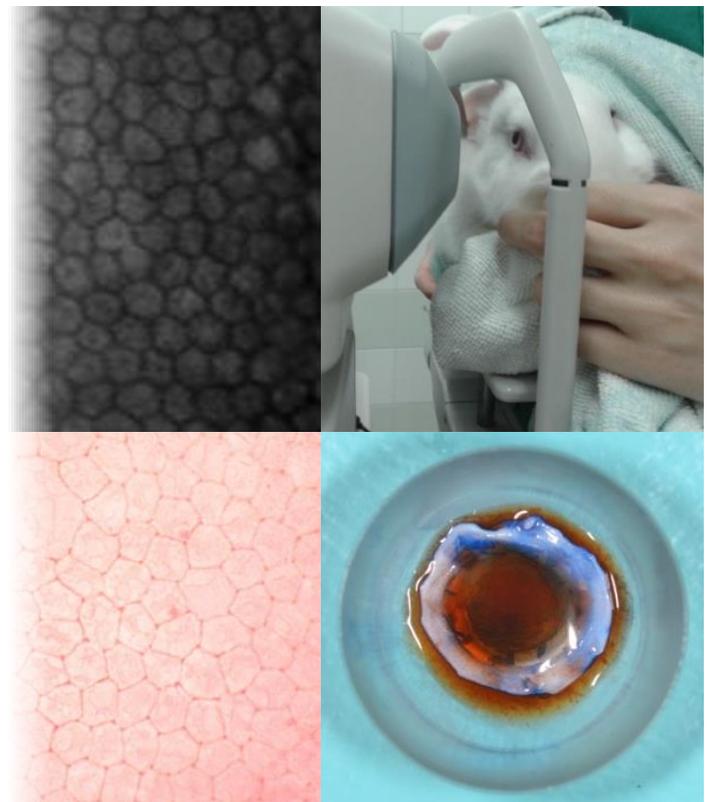
**Sergi Segarra López**

Directoras:

**Dra. Marta Leiva Repiso  
Dra. M<sup>a</sup> Teresa Peña Giménez**

Tutora:

**Dra. Marta Leiva Repiso**



**Doctorat en Medicina i Sanitat Animals**

Departament de Medicina i Cirurgia Animals - Facultat de Veterinària

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

2016





**Programa de Doctorat en Medicina i Sanitat Animals**

**Departament de Medicina i Cirurgia Animals**

**Facultat de Veterinària**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Estudios de escalada de dosis sobre  
los efectos del Cloruro de Benzalconio  
intracameral en conejos:  
UN MODELO ANIMAL DE  
ENFERMEDAD ENDOTELIAL CORNEAL**

Memoria presentada por:

**Sergi Segarra López**

para optar al grado de

Doctor en Veterinaria

Bellaterra, 6 de julio de 2016

Directoras de tesis:

**Dra. Marta Leiva Repiso y Dra. M<sup>a</sup> Teresa Peña Giménez**



Las Doctoras **Marta Leiva Repiso** y **María Teresa Peña Giménez** del Departament de Medicina i Cirurgia Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada “**Estudios de escalada de dosis sobre los efectos del Cloruro de Benzalconio intracameral en conejos: UN MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD ENDOTELIAL CORNEAL**”, la memoria de la cual es presentada por **Sergi Segarra López** para optar al Grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo nuestra supervisión y, considerándola finalizada, autorizamos su presentación para que ésta sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado.

Marta Leiva Repiso

M<sup>a</sup> Teresa Peña Giménez

Bellaterra, 17 de mayo de 2016.



***Als meus pares  
i a la Maria.***

***“Life is short, so learn from your mistakes  
and stand behind the choices that you make.”***

John Petrucci.



---

***AGRAÏMENTS***

**AGRADECIMIENTOS**

***ACKNOWLEDGEMENTS***

---



Per a mi, avui és un dia molt important; un punt i seguit. S'acaba un període que m'ha aportat molt, tan en l'àmbit científic com en el personal. És per això que m'agradaria agrair les contribucions de totes les persones que hi han estat implicades, així com el recolzament de tots els que heu permès que ho hagi pogut aconseguir. He de reconèixer que se'm fa difícil expressar-ho en paraules.

En primer lloc, he d'agrair a les meves directores de tesi, la Dra. Teresa Peña i la Dra. Marta Leiva, que m'oferissin la possibilitat de cursar el programa de doctorat sota la seva supervisió i formant part del seu grup de recerca. Acceptar aquesta oferta va ser una decisió realment encertada. Els sacrificis i esforços que ha implicat han valgut la pena sobradament. De la Marta i la Teresa he après a valorar la importància de la feina ben feta, el treball sistemàtic i l'autoexigència personal. Moltíssimes gràcies!

També vull agrair tota l'ajuda rebuda per part dels meus companys, Dani, Natàlia, Adán, Rodrigo, Fernando i Martí. D'una manera o altra, tots heu participat en aquests estudis. Tot i que el fet de tractar-se d'un doctorat a temps parcial ha fet que la meua presència i participació en activitats del grup hagi estat força limitada, m'heu fet sentir com un més de l'equip.

De la mateixa manera, agraïm el suport del Dr. Manel López-Béjar i de la resta de membres de la Unitat d'Embriologia del Departament d'Anatomia i Sanitat Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona, per compartir les seves instal·lacions i instrumental amb nosaltres, facilitar-nos la feina i assistir-nos en els aspectes tècnics sempre que ha estat necessari.

A la Carol i al Jose, per la seva ajuda i tot el temps i esforç que han dedicat a aquests estudis.

Als protagonistes indispensables d'aquests experiments: els conills. Vull pensar que la seva contribució a la ciència haurà estat meritòria i que representaran un pas més en el continu avenç de la investigació científica. És per això que voldria també donar les gràcies a tot el personal de l'Escorxador Industrial de Conills J. Grau SL de Calaf, i a Mularcun SL de Xert, i

especialment a l'Iván i a l'Óscar.

Moltíssimes gràcies a Bioibérica, empresa per a la qual he estat treballant des de fa més de quatre anys, al Departament d'Investigació i Desenvolupament de la Divisió de Salut Animal. Tirar endavant simultàniament un doctorat a temps parcial i una feina tan exigent a temps complet és complicat, però tot és més senzill si hi ha bona predisposició per part de tothom. Per això vull agrair a Bioibérica, i especialment a Josep Escaich, Purificación Morales, Alfonso Velasco i Xavier Córdoba, les facilitats que m'han donat per tal de poder compaginar aquestes dues activitats. Aquests últims anys he crescut molt professionalment, i no hauria estat possible sense vosaltres. De debò, gràcies!

To the Bristol University Small Animal Referral Hospital and to Langford Veterinary Services, and especially to Kate Murphy, Domingo Casamian and Angie Hibbert. First of all, for picking me; and mainly, for teaching and inspiring me. I'm also very thankful to Dr. Kostas Pappasoulis and Dr. Chris Helps for being able to show me how amazing the world of research can be. Turning someone so clinically-oriented into a researcher is something that clearly deserves acknowledgment. It is no exaggeration to say that you guys changed my life. Thanks!

Aprofitaré per esmentar i donar el reconeixement que es mereixen als oftalmòlegs i investigadors amb els que he tingut la sort de poder passar algunes setmanes, mesos o anys. Tots i cadascun d'ells han aportat el seu granet de sorra i, d'alguna manera, han influït en què acabi on sóc avui. Al Dr. John Sapienza, per permetre'm gaudir de la oftalmologia y contagiarme de su entusiasmo por esta disciplina clínica. To Christine Heinrich and Heidi Featherstone at Willows Veterinary Centre and Referral Service; to Dr. Richard J. Mc Mullen and Dr. Alison Clode at North Carolina State University; to Brian Patterson, Tim Knott and Elena Romero at Rowe Veterinary Group; i al Francesc Bertrolí, per la seva paciència i bona predisposició. També vull agrair al Centre d'Oftalmologia Barraquer de Barcelona que em permetessin passar uns dies a les seves instal·lacions. Va ser una experiència inoblidable. And last

but not least, I want to thank Pip Boydell at the Animal Medical Centre Referral Services in Manchester; Pip, you probably don't even know it, but it might be because of you that I got interested in ophthalmology in the first place. For that, I'll always be truly grateful to you.

Voldria aprofitar per donar també les gràcies als meus amics i als companys de facultat, sobretot a un grup molt especial. Jaume, Débo, Gerard, Cris, Júlia, Núria, Mariona, Montbrau, Muns, Eli, Roberto, Laura, Edu, Mikel, Marina i companyia: gràcies per tots els moments que hem viscut junts. Tots plegats vau fer que el meu pas per la facultat fos molt més agradable i heu fet que en guardi molt bons records. No són només hores de classes, pràctiques, treballs en grup, festes i altres activitats varies; l'any que ve farà ja 15 anys que ens vam conèixer en començar la carrera (sí, ja tenim una edat...) i sé que, si hem conservat aquesta amistat fins ara, la seguirem mantenint durant molt de temps.

A la meva família i especialment als meus pares, Josep i Montse, i al meu germà, Guillem. Dir que sense els meus pares no seria on sóc és una obvietat, però realment és així. M'enorgulleix (en el bon sentit, vosaltres ja m'enteneu) haver pogut rebre les vostres influències, haver pogut aprendre tot el que m'heu ensenyat, i haver disposat de la llibertat i la comprensió que sempre he trobat en vosaltres. Sé que esteu molt contents de veure el que he aconseguit, i mai deixaré d'esforçar-me per fer que us senti orgullosos de mi.

Finalment, a la Maria. Per no deixar mai de creure en mi, recolzar-me en tots els sentits i animar-me en tot moment. Tenir-te de companya de camí és un privilegi. Per la teva participació en els estudis d'aquesta tesi, implicant-te desinteressadament, gaudint de meravellosos caps de setmana revisant els conillets a l'hospital de la UAB, invertint dies de vacances a la platja comptant cèl·lules amb l'ordinador, etc. Pels teus suports logístic i tècnic, imprescindibles. Per tot això i per tot el que em deixo, et mereixes sobradament que et dediqui aquesta tesi.

Moltes gràcies a tots!



---

# ÍNDICE

---



## **Índice general**

<b>ÍNDICE</b> .....	1
Índice general .....	3
Índice de abreviaturas.....	8
Índice de tablas.....	10
Índice de figuras.....	11
Terminología .....	12
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
1. Córnea.....	15
1.1. Embriología ocular .....	15
1.2. Anatomía corneal.....	22
1.3. Fisiología corneal.....	25
Funciones del epitelio.....	25
Funciones del estroma .....	26
Funciones del endotelio.....	26
2. Capacidad regenerativa de la córnea.....	29
2.1. Reparación epitelial .....	29
2.2. Reparación estromal.....	29
2.3. Reparación endotelial .....	30
3. Enfermedad endotelial corneal.....	34
3.1. Endoteliopatías más frecuentes.....	34

3.2. Métodos de evaluación del endotelio.....	37
3.2.1. Métodos de evaluación del endotelio in vivo .....	38
3.2.2. Métodos de evaluación del endotelio ex vivo .....	41
3.3. Tratamiento actual de la enfermedad endotelial corneal .....	44
3.4. Futuros tratamientos de enfermedades endoteliales .....	47
4. Modelos actuales de enfermedad endotelial corneal.....	48
5. Toxicidad del cloruro de benzalconio .....	51
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>55</b>
1. Hipótesis principal .....	57
2. Hipótesis secundarias .....	57
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
1. Objetivo principal .....	61
2. Objetivo secundario.....	61
<b>ESTUDIO <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>63</b>
1. Material y Métodos .....	65
1.1. Instalaciones .....	65
1.2. Ojos .....	65
1.3. Productos.....	65
1.4. Diseño experimental .....	66
1.4.1. Evaluación prequirúrgica .....	66
1.4.2. Inyecciones intracamerales .....	67
1.4.3. Seguimiento .....	68

1.4.4. Tinciones vitales .....	69
1.4.5. Análisis estadístico .....	71
2. Resultados.....	72
2.1. Biomicroscopía .....	72
2.2. Microscopía especular y paquimetría .....	73
2.3. Tinciones vitales .....	76
2.3.1. Hexagonalidad.....	78
2.3.2. Mortalidad.....	79
3. Interpretación de resultados del estudio ex vivo.....	80
<b>ESTUDIO <i>in vivo</i></b> .....	81
1. Material y Métodos .....	83
1.1. Instalaciones .....	83
1.2. Conejos.....	83
1.3. Productos.....	84
1.4. Diseño experimental .....	84
1.4.1. Evaluación prequirúrgica .....	84
1.4.2. Inyecciones intracamerales .....	85
1.4.3. Seguimiento .....	87
1.4.4. Eutanasia y enucleación.....	87
1.4.5. Tinciones vitales .....	88
1.4.6. Histopatología .....	88
1.4.7. Análisis estadístico .....	89

2. Resultados.....	90
2.1. Exploración oftalmológica .....	90
2.2. Paquimetría.....	94
2.3. Microscopía especular .....	96
2.4. Tinciones vitales .....	98
2.5. Histopatología .....	99
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
Discusión sobre los resultados biomicroscópicos .....	103
Discusión sobre los hallazgos especulares y paquimétricos.....	105
Discusión sobre las tinciones vitales.....	107
Discusión de los hallazgos histopatológicos .....	110
Nuevo modelo de enfermedad endotelial corneal.....	112
Limitaciones de los estudios .....	115
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>117</b>
<b>FUTUROS ESTUDIOS.....</b>	<b>121</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>125</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>133</b>
Anexo 1: Hoja de exploración oftalmológica.....	135
Anexo 2: Hoja de seguimiento para el estudio ex vivo. ....	136
Anexo 3: Hoja de seguimiento para el estudio in vivo. ....	137
Anexo 4: Tabla de aleatorización de ojo inyectado en estudio in vivo.	138

Anexo 5: Hoja de hospitalización para los conejos del estudio in vivo.	139
Anexo 6: Hoja de evaluación del dolor para el estudio in vivo.....	141
Anexo 7: Tablas de resultados del estudio ex vivo.....	142
Anexo 8: Tablas de resultados del estudio in vivo.....	144
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>149</b>

## **Índice de abreviaturas**

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ARVO	<i>Association for the Research in Vision and Ophthalmology</i>
BAC	<i>Benzalkonium chloride</i> (Cloruro de Benzalconio)
BSS	<i>Balanced Salt Solution</i> (Solución salina balanceada)
CCT	<i>Central Corneal Thickness</i> (Espesor corneal central)
CE	<i>Corneal endothelium</i> (Endotelio corneal)
CECs	<i>Corneal endothelial cells</i> (Células Endoteliales Corneales)
CEEAH	<i>Comissió Ètica d'Experimentació Animal i Humana</i>
CHED	<i>Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy</i>
CV	Coeficiente de Variación
DLEK	<i>Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty</i>
DMAEK	<i>Descemet's Membrane Automated Endothelial Keratoplasty</i>
DMEK	<i>Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty</i>
DSAEK	<i>Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty</i>
DSEK	<i>Descemet's Stripping Endothelial Keratoplasty</i>
ECD	<i>Endothelial Cell Density</i> (Densidad de CECs)
GEE	<i>Generalized Estimating Equations</i>
ICI	<i>Intracameral injection</i> (Inyección intracameral)
IOP	<i>Intraocular Pressure</i> (Presión Intraocular)
MCA	<i>Mean Cell Area</i> (Superficie media de CECs)
N-CAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i> (Tomografía de coherencia óptica)
OD	Ojo derecho
OS	Ojo izquierdo

PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Solución salina tamponada con fosfato)
PKP	<i>Penetrating Keratoplasty</i> (Queratoplastia penetrante)
PPD	<i>Posterior Polymorphous Dystrophy</i> (Distrofia polimórfica posterior)
ROCK	Rho quinasa
RPE	<i>Retinal Pigment Epithelium</i> (Epitelio Pigmentario de la Retina)
SD	<i>Standard Deviation</i> (Desviación estándar)
SE	<i>Standard Error</i> (Error estándar)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopía electrónica de barrido)
SNC	Sistema Nervioso Central
TASS	<i>Toxic Anterior Segment Syndrome</i> (Síndrome tóxico del segmento anterior)
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopía electrónica de transmisión)
TGF- $\beta$ 2	<i>Transforming Growth Factor-beta 2</i>
TJ	<i>Tight Junction</i> (Unión estrecha)
TSCM	<i>Tandem Scanning Confocal Microscopy</i> (Microscopía confocal de barrido en tándem)
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona

## **Índice de tablas**

**Tabla 1**, pág. 50

**Tabla 2**, pág. 52

**Tabla 3**, pág. 72

**Tabla 4**, pág. 78

**Tabla 5**, pág. 79

**Tabla 6**, pág. 91

**Tabla 7**, pág. 92

**Tabla 8**, pág. 93

**Tabla 9**, pág. 98

**Tabla 10**, pág. 100

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> , pág. 16	<b>Figura 19</b> , pág. 42	<b>Figura 37</b> , pág. 88
<b>Figura 2</b> , pág. 16	<b>Figura 20</b> , pág. 42	<b>Figura 38</b> , pág. 88
<b>Figura 3</b> , pág. 17	<b>Figura 21</b> , pág. 43	<b>Figura 39</b> , pág. 94
<b>Figura 4</b> , pág. 18	<b>Figura 22</b> , pág. 43	<b>Figura 40</b> , pág. 94
<b>Figura 5</b> , pág. 19	<b>Figura 23</b> , pág. 44	<b>Figura 41</b> , pág. 95
<b>Figura 6</b> , pág. 19	<b>Figura 24</b> , pág. 44	<b>Figura 42</b> , pág. 96
<b>Figura 7</b> , pág. 20	<b>Figura 25</b> , pág. 49	<b>Figura 43</b> , pág. 97
<b>Figura 8</b> , pág. 21	<b>Figura 26</b> , pág. 54	<b>Figura 44</b> , pág. 98
<b>Figura 9</b> , pág. 24	<b>Figura 27</b> , pág. 67	<b>Figura 45</b> , pág. 100
<b>Figura 10</b> , pág. 25	<b>Figura 28</b> , pág. 68	
<b>Figura 11</b> , pág. 27	<b>Figura 29</b> , pág. 70	
<b>Figura 12</b> , pág. 28	<b>Figura 30</b> , pág. 73	
<b>Figura 13</b> , pág. 33	<b>Figura 31</b> , pág. 74	
<b>Figura 14</b> , pág. 35	<b>Figura 32</b> , pág. 75	
<b>Figura 15</b> , pág. 37	<b>Figura 33</b> , pág. 76	
<b>Figura 16</b> , pág. 39	<b>Figura 34</b> , pág. 77	
<b>Figura 17</b> , pág. 40	<b>Figura 35</b> , pág. 78	
<b>Figura 18</b> , pág. 41	<b>Figura 36</b> , pág. 85	

## Terminología

### **Condiciones escotópicas:**

Condiciones con niveles bajos de iluminación.

### **Paracentesis ocular:**

Punción del ojo con una aguja, que generalmente se realiza a través de la cámara anterior.

### **Pleomorfismo celular:**

Alteración de la típica forma de las células, mostrando formas variadas. En el caso del endotelio corneal, el pleomorfismo disminuye el porcentaje de hexagonalidad considerado como fisiológico para cada especie.

### **Polimegatismo celular:**

Incremento de tamaño celular que induce aumento del coeficiente de variación.

### **Tapetum lucidum:**

Capa reflectante situada en la coroides, en la mayoría de las especies animales, que refleja la luz visible con el fin de aumentar la luz disponible para los fotorreceptores. Este efecto mejora la visión en condiciones escotópicas.

### **Visión estereoscópica:**

En óptica, optometría y oftalmología, la visión estereoscópica o binocular es el tipo de visión en el que los dos ojos se utilizan conjuntamente.

---

# INTRODUCCIÓN

---



## 1. Córnea

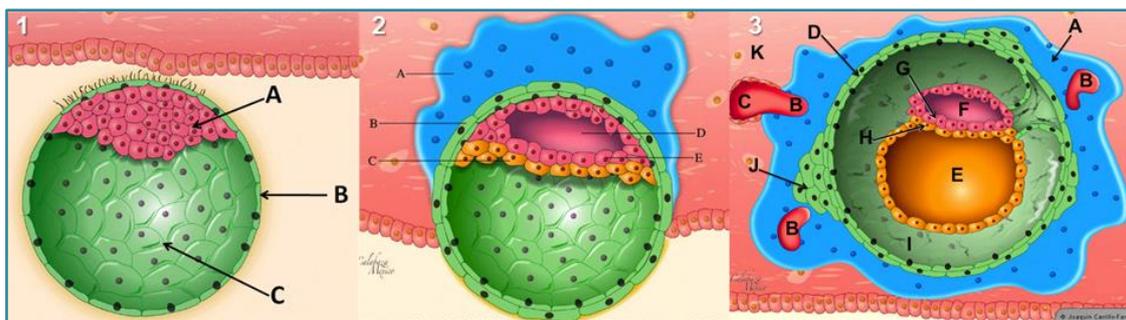
### 1.1. Embriología ocular

El origen embrionario de las distintas estructuras oculares es diverso y sigue una secuencia muy parecida en todas las especies de mamíferos.

A grandes rasgos, el desarrollo embrionario y fetal del ojo ocurre en tres fases:

1. **Embriogénesis:** empieza con la fertilización y termina con la diferenciación de las distintas capas germinales.
2. **Organogénesis:** formación de los diferentes órganos.
3. **Diferenciación:** desarrollo específico de las características estructurales de cada órgano.<sup>1</sup>

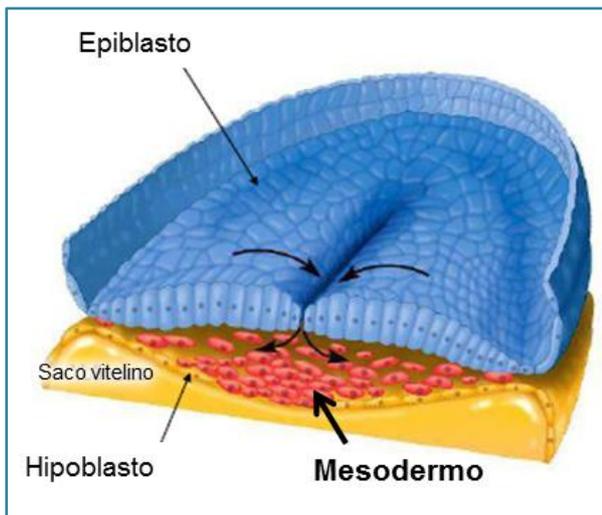
La **especie canina** es una de las especies animales en la que se ha estudiado el desarrollo embrionario ocular en profundidad. Tras la fertilización, el **zigoto** se divide por mitosis sucesivas hasta alcanzar un clúster de 12-16 células, también denominado **mórula**, que continúa con la proliferación celular, hasta llegar a la fase de **blastocisto**. En esta fase, las células se diferencian y reubican, formando parte de la capa externa del blastocisto (**trofoblasto**) o de la masa celular interna o **embrioblasto** (Fig. 1). Este último se diferencia a su vez en dos capas, el **hipoblasto** y el **epiblasto** (fase de **disco bilaminar**). Las células de estas dos capas se reestructuran dejando dos cavidades, una inferior llamada **saco vitelino**, y otra superior llamada **cavidad amniótica**.



**Figura 1.** 1. **Blastocisto:** A, Masa celular interna; B, Trofoblasto; C, Blastocelo. 2. **Disco bilaminar:** A: Sincitiotrofoblasto; B: Citotrofoblasto; C: Hipoblasto; D: Cavidad amniótica; E: Epiblasto; 3. **Blástula:** A: Sincitiotrofoblasto; B: Lagunas trofoblásticas; C: Sinusoide materno; D: Citotrofoblasto; E: Saco vitelino; F: Cavidad amniótica; G: Epiblasto; H: Hipoblasto; I: Celoma extraembrionario; J: Vellosidades primarias; K: Estroma del endometrio. Fuente: modificado a partir de [http://sosembriologiahumana.blogspot.com.es/2010\\_09\\_01\\_archive.html](http://sosembriologiahumana.blogspot.com.es/2010_09_01_archive.html)

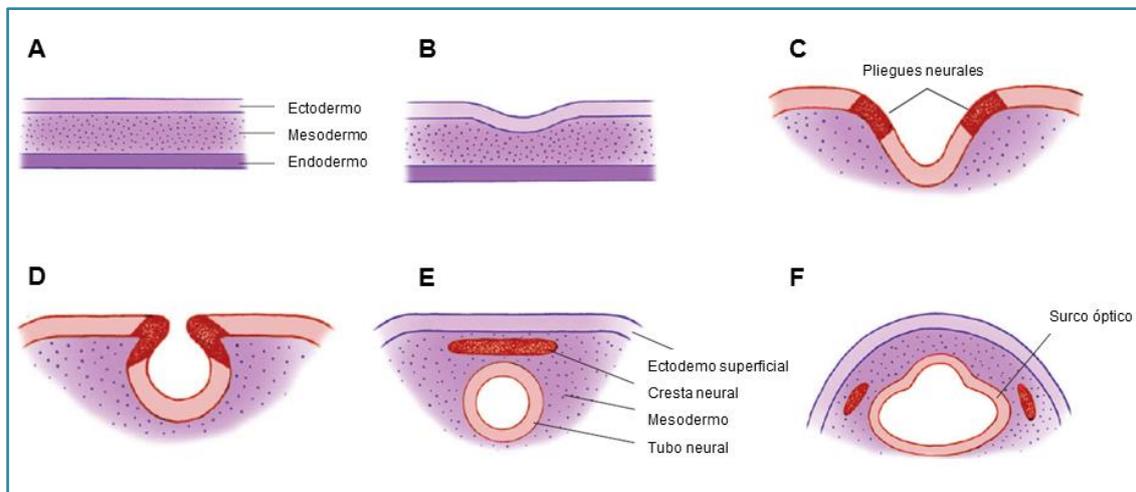
La **gastrulación**, o formación de la capa germinal mesodérmica, se inicia en el perro el **día 10 de gestación**, en dirección cráneo-caudal y consiste en la migración celular de algunas células del epiblasto hacia el espacio entre el epiblasto y el hipoblasto (Fig. 2). De este modo, se formarán las tres capas germinales: el **ectodermo** (a partir del epiblasto), el **endodermo** (a partir del hipoblasto) y el **mesodermo** (a partir de las células que se han invaginado del epiblasto).

**Figura 2.** Representación de las capas del disco embrionario: epiblasto e hipoblasto. Las células del epiblasto se invaginan para formar el mesodermo. Fuente: modificado a partir de [http://viarevision.wikia.com/wiki/origin\\_of\\_cells](http://viarevision.wikia.com/wiki/origin_of_cells).



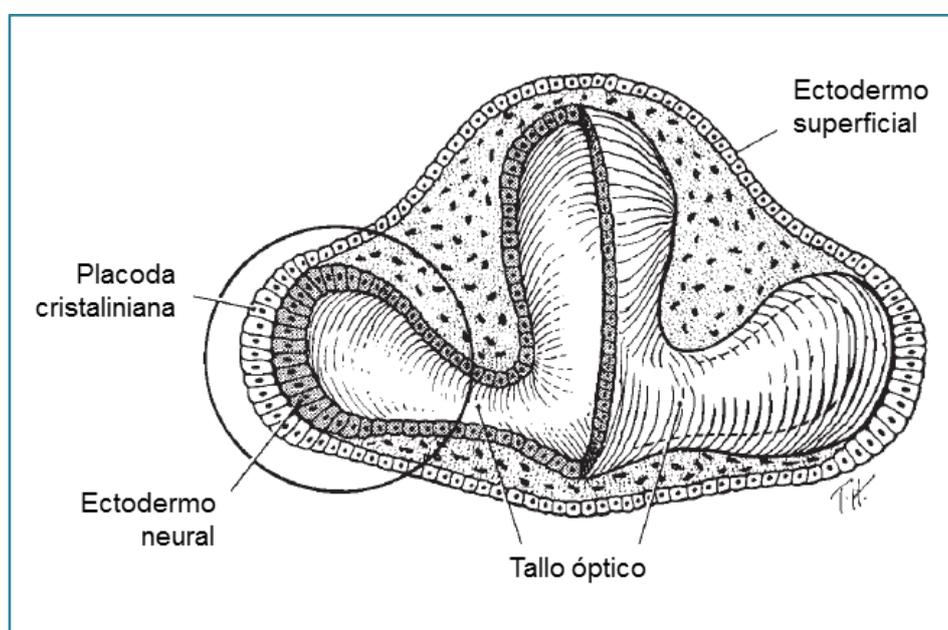
El ectodermo aumenta de grosor dando lugar a la **placa neural**, para posteriormente invaginarse siguiendo el eje antero-posterior y formar el **surco**

**neural**. Simultáneamente a la formación del éste, se crean dos pliegues (**pliegues neurales**), que darán lugar al futuro cerebro, que se fusionan formando el **tubo neural** y las **crestas neurales**. El ectodermo superficial con aspecto columnar se denominará a partir de este momento **ectodermo neural**. A medida que los pliegues neurales se elevan y se acercan uno a otro, una población de células mesenquimales especializadas, **las crestas neurales**, emigran desde la zona de unión entre el ectodermo neural y el ectodermo superficial (Fig. 3). Esta migración está facilitada por la matriz extracelular (rica en ácido hialurónico), que producida por el epitelio superficial y las crestas neurales, forma un espacio por el que las células de las crestas puedan migrar. La fibronectina, producida por las células del ectodermo neural, marcará los límites de la migración.



**Figura 3.** A, Sección vertical del disco embrionario que muestra las tres capas: ectodermo, mesodermo y endodermo; B, Formación del surco neural en la placa neural del ectodermo; C, El surco neural se invagina y se forman los pliegues neurales; D, Los pliegues neurales avanzan el uno hacia el otro; E, En el momento en que se fusionan los dos pliegues, se forma el tubo neural y las células de las crestas neurales se separan del ectodermo. El tubo neural quedará por lo tanto formado por ectodermo neural, y el ectodermo superficial vuelve a ser continuo; F, Se crean unas evaginaciones formando los surcos ópticos. Fuente: modificado a partir de Ofri R. *Development and Congenital Abnormalities*. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008:20-32.

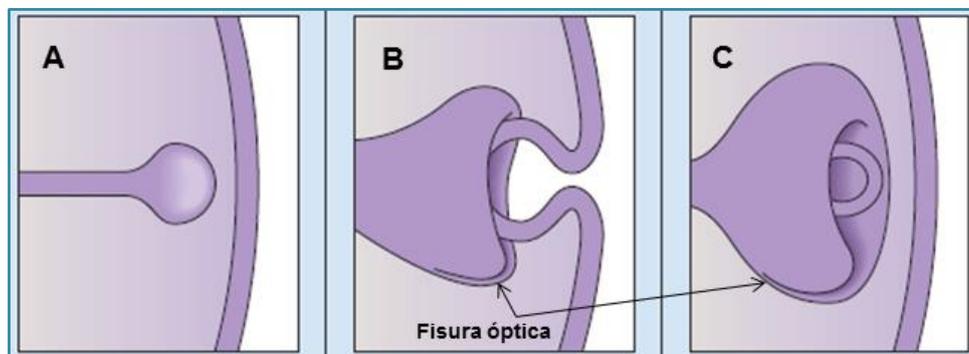
La primera manifestación del desarrollo ocular en el perro ocurre con la aparición de un **surco óptico**, a cada lado del cerebro anterior (diencéfalo), el **día 13** tras la fertilización.<sup>1</sup> El **día 15** estos surcos se transforman en evaginaciones localizadas a ambos lados del cerebro, denominadas **vesículas ópticas**, marcando el inicio de la organogénesis. Estas vesículas crecen hacia fuera y contactan con el ectodermo superficial de la cara del embrión, lo que induce el engrosamiento de sus células, llamado **placoda cristaliniiana** (**día 17**) (Fig. 4).<sup>2</sup>



**Figura 4.** Estadio de vesícula óptica. El ectodermo superficial que cubre la vesícula óptica acabará formando la placoda cristaliniiana. Fuente: Cook CS. *Ocular Embryology and Congenital Malformations*. In: Kirk N. Gelatt *Veterinary Ophthalmology*. New York: Wiley-Blackwell; 2007:3-38.

Tanto la placoda cristaliniiana como la vesícula óptica se invaginan –de inferior a superior–, para dar lugar a la **vesícula lenticular** y a la **copa óptica**, respectivamente. La copa óptica es una estructura de pared doble que dará origen a la retina neural (derivada de la pared interna) y al epitelio pigmentario de la retina (*Retinal Pigment Epithelium* (RPE); derivado de la pared externa).

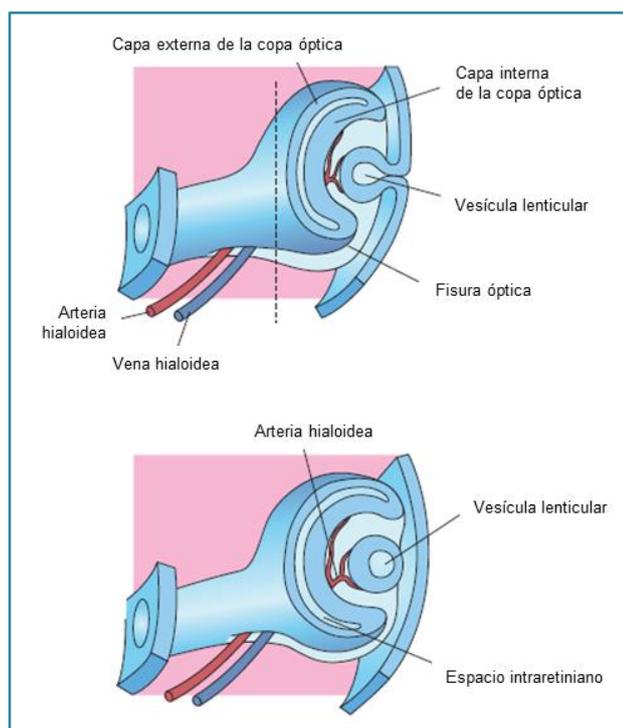
En esta etapa, la copa óptica presenta una hendidura a lo largo de su parte inferior, conocida como **fisura óptica** (Fig. 5).<sup>1</sup>



**Figura 5.** Formación de la vesícula óptica (A), copa óptica (B) y vesícula lenticular (C). Fuente: modificado a partir de Ofri R. *Development and Congenital Abnormalities*. In: Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008:20-32.

La vesícula lenticular, que ha seguido invaginándose, se despegá totalmente del ectodermo superficial, lo que dará lugar al inicio de las cámaras del ojo. En este momento, la arteria hialoidea, de origen mesenquimatoso y cuya función es vascularizar al cristalino, entra por la fisura óptica de la copa óptica (Fig. 6).

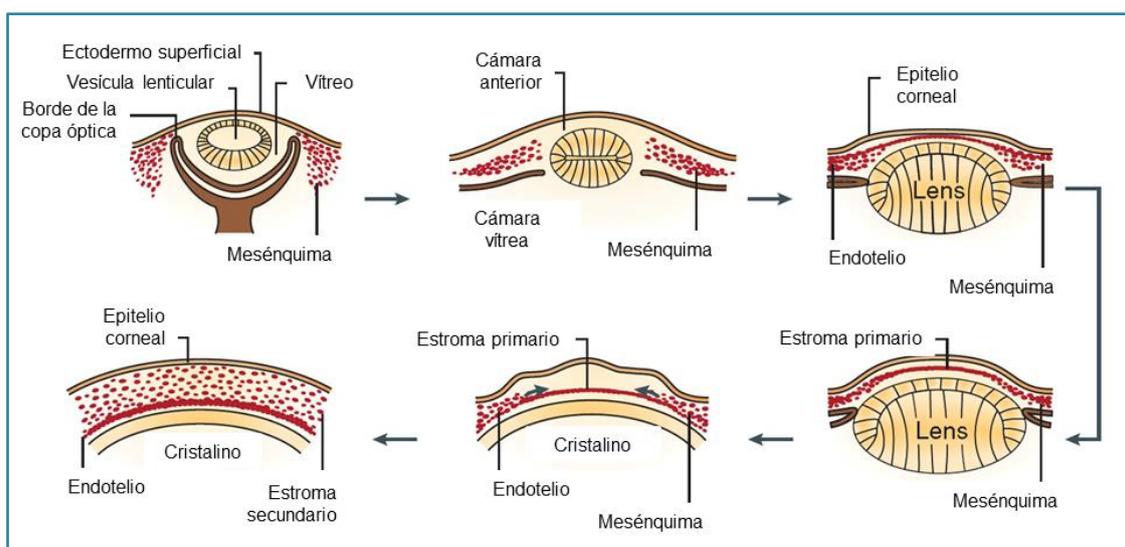
**Figura 6.** Secciones del desarrollo del ojo, mostrando la evolución de la copa óptica y la vesícula lenticular. Fuente: modificado a partir de Ofri R. *Development and Congenital Abnormalities*. In: Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008:20-32.



En este punto, se da por finalizada la organogénesis y se inicia la fase de diferenciación.

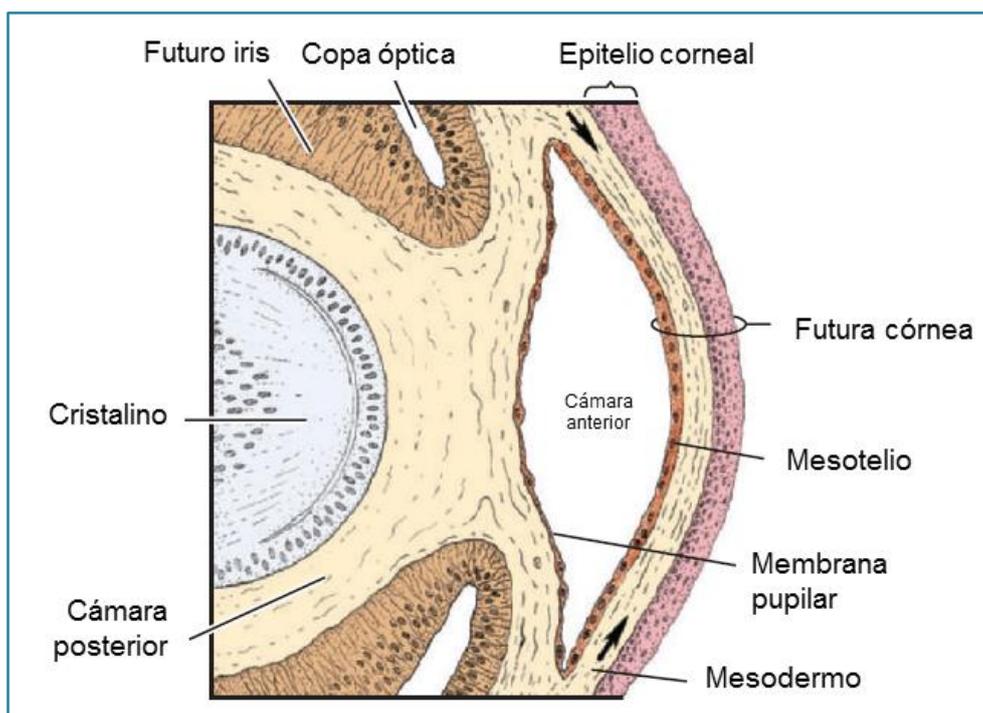
El **día 27 de gestación** la vesícula lenticular se recubre de una capa formada por células cuboidales de la placoda, que dará lugar a la futura cápsula del cristalino. Dos días más tarde (día 29), la fisura óptica se fusiona, estableciendo la presión intraocular (IOP) definitiva. La retina primitiva promueve la formación de las fibras lenticulares a partir de las células epiteliales adyacentes (células de la cápsula posterior). Estas fibras darán lugar al futuro núcleo embrionario del cristalino.

El **día 32 de gestación**, se fusionan los párpados, la cámara anterior del ojo empieza a formarse, y se unen además las capas de la copa óptica. También es en esta fase cuando se diferencia el endotelio corneal, el estroma corneal acelular y la esclera. Tanto el **endotelio** como el **estroma** corneal provienen de las crestas neurales, mientras que el **epitelio** corneal proviene del ectodermo superficial. Las células endoteliales se encargan de producir la **membrana de Descemet** durante toda la vida del individuo (Fig. 7).



**Figura 7.** Desarrollo embrionario de la córnea. Se puede apreciar como el endotelio corneal proviene de la invasión de la córnea por parte de células mesenquimales de las crestas neurales. Fuente: Zavala J, López Jaime GR, Rodríguez Barrientos CA, Valdez-García J. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. Eye. 2013;27(5):579-588.

En el espacio comprendido entre la córnea y el cristalino se forman las **cámaras anterior** y **posterior**. Seguidamente, la membrana pupilar, situada en el aspecto central del iris, desaparecerá para formarse la **pupila**, que permitirá el flujo de humor acuoso desde la cámara posterior a la anterior (Fig. 8).<sup>1,3-7</sup>



**Figura 8.** Formación de la cámara anterior y de la córnea. La membrana pupilar aparece cubriendo la futura pupila. Fuente: modificado a partir de Ofri R. *Development and Congenital Abnormalities*. In: Slatter's *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008:20-32.

Durante el **día 40 de gestación** se forman las fibras secundarias del cristalino, ubicándose alrededor del núcleo embrionario y uniéndose unas con otras en la zona conocida como "suturas en Y". Durante esta fase aparece el cuerpo ciliar, el iris y los músculos extraoculares. Una zona de concentración del vítreo, denominado vítreo terciario, dará lugar a la zónula ciliar. Las capas de la coroides están completas y pigmentadas.

El **día 45 de gestación** los procesos ciliares tocan el ecuador del cristalino, se observa pigmento en el iris y aparecen los primeros y rudimentarios

fotorreceptores. Tras el inicio de la producción de humor acuoso en el cuerpo ciliar, ya no hay necesidad de nutrir el cristalino de forma directa, por lo que se empieza a atrofiar la arteria hialoidea, en dirección anteroposterior. La atrofia debe completarse antes del día 14 después del nacimiento.

Durante el **día 56 de gestación**, aparece el músculo ciliar, y el *Tapetum lucidum* y el RPE finalizan su desarrollo.

## **1.2. Anatomía corneal**

La **córnea** es un tejido transparente que, junto con la esclera, forma la túnica externa del ojo (túnica fibrosa). Su curvatura y **transparencia** permiten que sea la estructura con mayor poder de refracción del ojo. La transparencia se establece y mantiene gracias a una serie de características tales como: densidad celular baja, estado de deshidratación relativo, superficie ocular lisa, correcta ordenación de las fibras de colágeno estromales y ausencia de vasos, queratina y pigmento.<sup>4</sup>

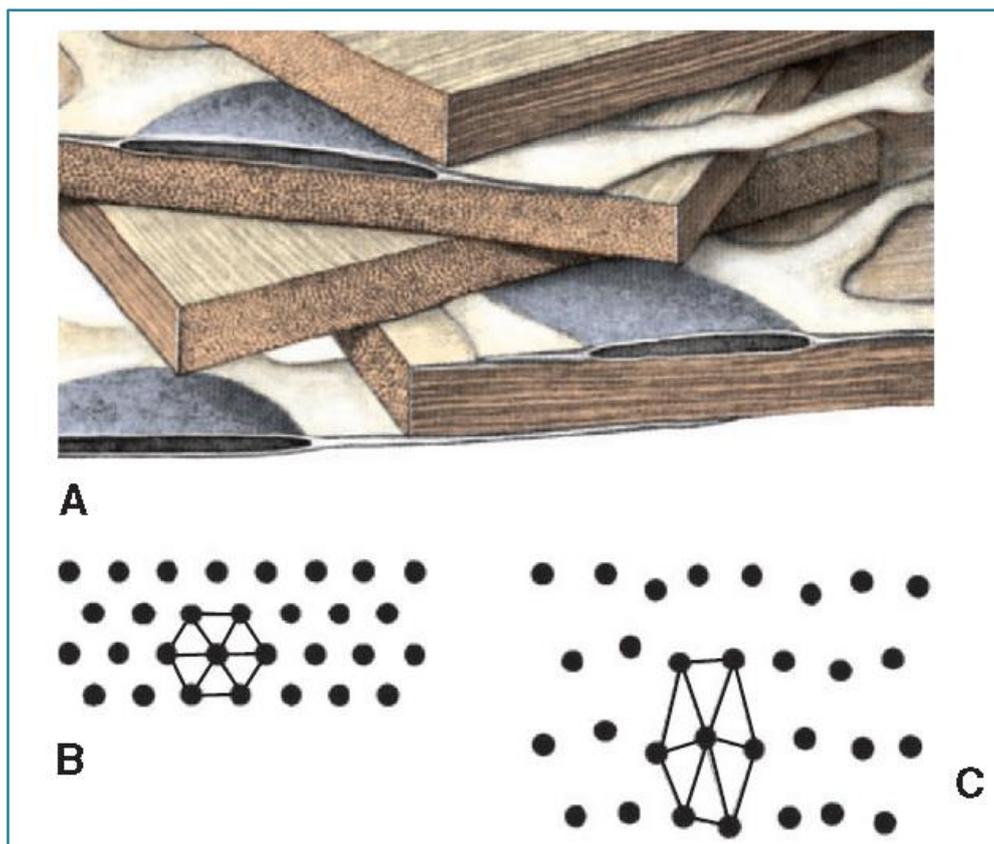
La histología y anatomía de la córnea varían ligeramente según las especies, pudiendo estar formada por 4-6 capas, que de exterior a interior son: epitelio, membrana de Bowman, estroma, capa de Dua, membrana de Descemet y endotelio.

- El **epitelio corneal** es el epitelio estratificado, escamoso y no queratinizado más organizado del organismo. El número de capas varía según la especie animal, siguiendo en todas ellas la siguiente estructura básica: capa de células basales, capas de células aladas y capas de células escamosas superficiales.<sup>4</sup> La adherencia de las células basales a su membrana basal se consigue mediante dos mecanismos principales: a través de la interacción

molecular directa de receptores con ligandos situados en la matriz extracelular (integrinas, cadherinas y *neural cell adhesion molecule* (N-CAM)), y a través de hemidesmosomas de unión.<sup>8</sup>

- La **membrana de Bowman** es una capa transparente, linear, continua y elástica que está presente en la mayoría de primates (incluyendo al ser humano), aves y herbívoros (conejo, ciervo, jirafa, buey, cebú,...).<sup>9</sup> Se considera la membrana basal del epitelio corneal.
- El **estroma** constituye el 90% del espesor corneal y está compuesto principalmente por fibras de colágeno, sustancia fundamental y queratocitos (fibroblastos modificados). A su vez, la sustancia fundamental está formada por proteoglicanos y glicosaminoglicanos asociados, mayoritariamente condroitín sulfato y dermatan sulfato.

Las fibrillas de colágeno se ordenan colocándose en paralelo y formando láminas que intercalan queratocitos con linfocitos, macrófagos y neutrófilos ocasionales. La distribución regular de las fibrillas de colágeno mantiene la transparencia corneal y distingue este tipo de colágeno del que encontramos en la esclera. La separación equidistante de las fibrillas se mantiene gracias a la acción de mucoproteínas, glicoproteínas y otros componentes de la sustancia fundamental. Esta separación exacta impide la dispersión de la luz y promueve la transparencia corneal (Fig. 9).<sup>4</sup> La ordenación normal de las fibrillas puede verse alterada por edema corneal, alteraciones en la sustancia fundamental, formación de cicatrices, o la infiltración de los espacios interlaminares por células (inflamatorias o tumorales) o sustancias (minerales o lípidos).

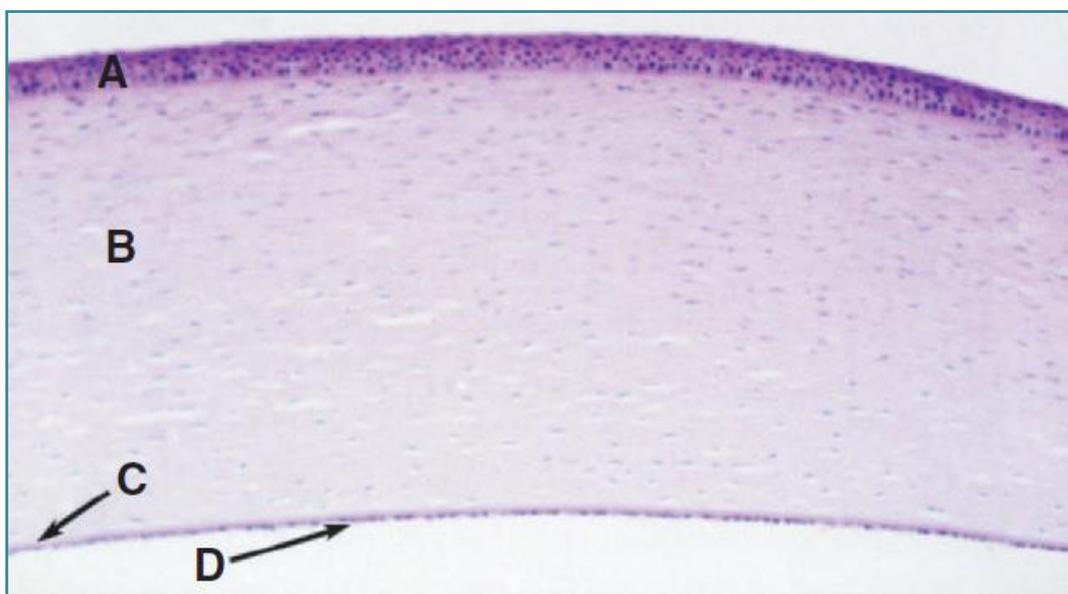


**Figura 9.** Estroma corneal. **A**, Laminillas de colágeno colocadas en paralelo en un ángulo determinado; **B**, Sección de la orientación normal de las fibrillas de colágeno estromales; **C**, Representación de fibrillas de colágeno que no siguen una correcta ordenación, resultando en dispersión de la luz y pérdida de transparencia. Fuente: Maggs DJ. Cornea and Sclera. In: Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008:175-202.

- La **membrana de Dua** es una capa descrita recientemente en humanos, que se encuentra situada entre el estroma y la membrana de Descemet. Se caracteriza por ser fina (15  $\mu\text{m}$ ) pero muy resistente, estar compuesta principalmente por colágeno tipo I y no presentar queratocito.<sup>10</sup>
- La **membrana de Descemet** es la membrana basal del endotelio corneal y se sitúa entre el estroma posterior y el endotelio. La produce el endotelio de forma continua durante toda la vida, lo cual hace que vaya engrosándose con la edad. De hecho, es la única estructura corneal que sigue creciendo a partir de los 2 años de edad en los seres humanos. Es una membrana muy elástica, pero puede llegar a romperse/adelgazarse en casos de buftalmia

secundaria a glaucoma. La elasticidad se pierde progresivamente con la edad.<sup>4,11</sup>

- El **endotelio corneal (CE)** es una fina monocapa semipermeable de células poligonales (mayoritariamente hexagonales) –también denominadas células endoteliales corneales (**CECs**)– situada en la parte más interna de la córnea, en contacto directo con el humor acuoso y la membrana de Descemet (Fig. 10). Su grosor varía según las especies (4 y 20  $\mu\text{m}$ ).<sup>3,4,12,13</sup>



**Figura 10.** Imagen microscópica de la córnea felina, que permite apreciar claramente sus capas: **A**, Epitelio; **B**, Estroma; **C**, Membrana de Descemet; **D**, Endotelio. Fuente: Maggs D.J. *Cornea and Sclera*. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008:175-202.

### 1.3. Fisiología corneal

#### **Funciones del epitelio**

El **epitelio corneal** lleva a cabo múltiples funciones, entre ellas: actuar de barrera física evitando la entrada de organismos patógenos, actuar de barrera lipofílica disminuyendo la absorción de sustancias hidrofílicas, proteger indirectamente el globo ocular mediante la inducción del reflejo del parpadeo,

contribuir al mantenimiento del estatus inmunoprivilegiado del ojo e inhibir la proliferación neovascular corneal.<sup>14</sup>

### ***Funciones del estroma***

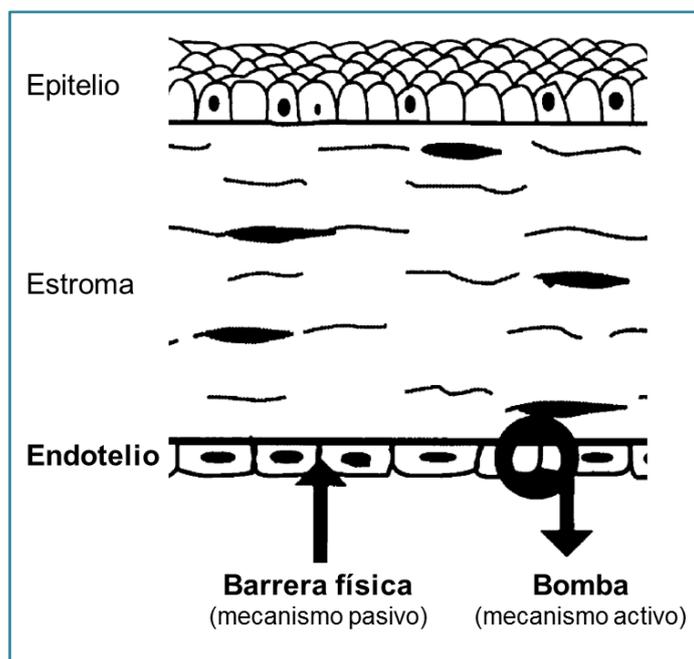
El **estroma** se encarga de mantener la integridad estructural, rigidez y curvatura del globo ocular, así como también de mantener la transparencia corneal. Estas acciones las consigue gracias a la perfecta estructuración de las fibrillas, la ausencia de vasos y pigmento, y a su baja celularidad.<sup>14</sup>

### ***Funciones del endotelio***

La **función principal del CE consiste en regular el estado de hidratación de la córnea**, manteniendo al estroma en un estado de relativa deshidratación. De este modo, el CE consigue preservar la separación equidistante de las fibrillas de colágeno y la transparencia corneal, permitiendo así que el ojo pueda llevar a cabo sus funciones visuales.

Por un lado, el CE actúa de **barrera física** (mecanismo físico o pasivo) impidiendo el movimiento de agua procedente de la cámara anterior hacia el estroma. Por otro lado, ejerce funciones de **bomba activa** (mecanismo activo) transportando activamente agua del estroma hacia la cámara anterior, en contra de un gradiente de presión y con un importante gasto energético (Fig. 11). El buen funcionamiento de este mecanismo de bombeo asegura el mantenimiento del espesor y transparencia corneal adecuados. Además, mediante mecanismos de difusión simple, difusión facilitada y transporte activo, el endotelio se encarga también de la circulación de nutrientes y productos de deshecho. El CE debe, por lo tanto, ejercer la función de barrera con cierta

permeabilidad selectiva, de modo que se cree un equilibrio y se mantenga la transparencia y la nutrición corneal simultáneamente.<sup>3,4,6,13-17</sup>

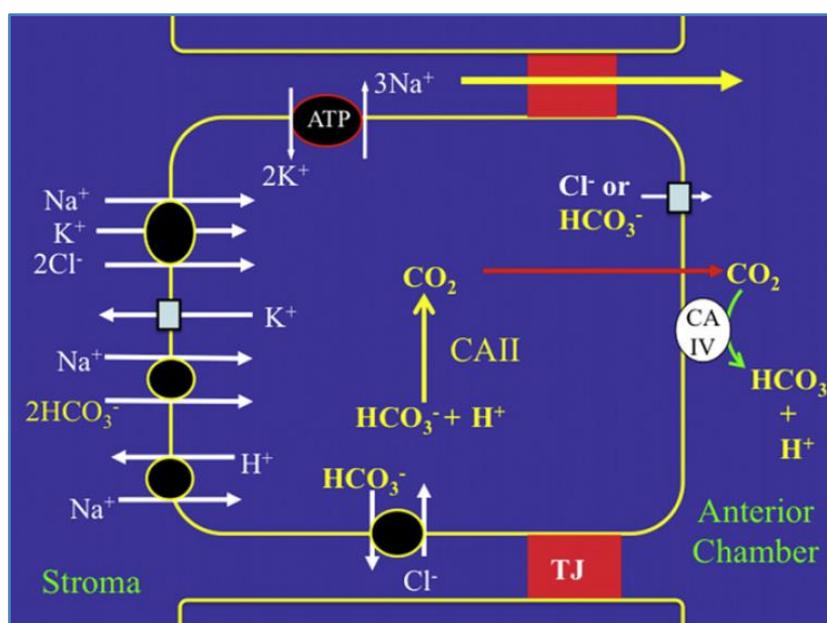


**Figura 11.** Esquema de la córnea en la que puede observarse como el endotelio ejerce una función de barrera para evitar que el estroma se hidrate en exceso. Para conseguir ese mismo objetivo, también bombea iones desde el estroma hacia el humor acuoso. Fuente: modificado a partir de Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. Exp Eye Res. 2005;81(6):629-638.

Exceptuando el oxígeno, todos los nutrientes que requiere la córnea para su mantenimiento llegan procedentes del humor acuoso y a través del CE.<sup>17</sup> El paso de estos nutrientes a través del CE hacia el estroma es posible ya que, a diferencia del epitelio, las uniones entre las CECs no son continuas (*zonula occludens* incompleta). Sin embargo, se requiere un mecanismo activo para mantener el equilibrio entre entrada y salida de humor acuoso: la bomba de iones.<sup>15</sup>

El buen funcionamiento de la barrera endotelial depende de la conservación del número adecuado de CECs, así como también de sus estrechas uniones intercelulares.<sup>11</sup>

La **bomba endotelial** ha sido ampliamente estudiada y actualmente sigue habiendo controversia acerca de qué iones son los que intervienen en el proceso. Se sabe que la bomba presenta actividad sodio-potasio ATPasa y que requiere de bicarbonato como sustrato, así como de anhidrasa carbónica. Entre los modelos de funcionamiento propuestos, cabe destacar el modelo de secreción de bicarbonato (Fig. 12).<sup>17</sup>



**Figura 12.** Modelo de secreción de bicarbonato. Posible mecanismo que explicaría el transporte de iones que tiene lugar en las CECs. El movimiento de iones de carga negativa crea una pequeña diferencia de potencial (0,5 mV) que atrae  $\text{Na}^+$  a través de las uniones estrechas (tight junctions (TJ)). Las elevadas concentraciones intracelulares de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ , junto con el potencial de membrana negativo, permiten que los aniones circulen luego a través de canales selectivos de iones. Otra vía para el flujo neto de  $\text{HCO}_3^-$  es aprovechando las altas concentraciones intracelulares de  $\text{HCO}_3^-$ , que puede convertirse en  $\text{CO}_2$ . Fuente: Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):2-7.

La función del CE puede evaluarse de **forma objetiva mediante fluorofotometría**, calculando el coeficiente de permeabilidad del endotelio corneal a la fluoresceína,<sup>18</sup> o de **forma indirecta mediante paquimetría**, valorando cambios en el espesor corneal.<sup>11,15</sup> Los estudios de funcionalidad pueden cumplimentarse con estudios morfológicos *in vivo* mediante **microscopía especular**.

## 2. Capacidad regenerativa de la córnea

La capacidad regenerativa de la córnea depende mayoritariamente de dos aspectos: la capa afectada y la especie animal. Cada capa se regenera a un ritmo diferente y mediante distintos mecanismos, que tiene importantes implicaciones clínicas.<sup>4,12</sup>

### 2.1. Reparación epitelial

El epitelio corneal se caracteriza por poseer **gran capacidad de regeneración**. Tras un daño epitelial, las células epiteliales que rodean al margen de la lesión reaccionan rápidamente retrayéndose, agrandándose y perdiendo sus hemidesmosomas de unión con la membrana basal/estroma, para después desplazarse de forma ameboidea hasta cubrir la zona afectada (**respuesta temprana**). Desafortunadamente, esto conlleva también que estas células epiteliales puedan arrastrar melanocitos procedentes del limbo esclero-corneal durante el proceso, afectando la transparencia corneal. Inicialmente el proceso de cicatrización induce la formación de un epitelio mucho más fino, que en los siguientes 4-7 días tras la completa reepitelización aumenta su índice mitótico (**respuesta tardía**), restaurando el grosor epitelial normal. Finalmente, y como último paso en el proceso de reepitelización, se regeneran los hemidesmosomas de unión.<sup>4</sup> La velocidad de la cicatrización epitelial se ha definido como 1 mm/día en el perro y 0,6 mm/día en el caballo.<sup>19,20</sup>

### 2.2. Reparación estromal

**El estroma se regenera más lentamente que el epitelio**, lo que hace que los defectos estromales sean inicialmente cubiertos por células epiteliales, siguiendo las dos fases previamente descritas. Lamentablemente la

reepitelización epitelial no restablece el grosor ni la curvatura normal de la córnea, siendo necesaria la regeneración estromal.<sup>19</sup>

El defecto estromal inicial presenta edema localizado, por la pérdida de la barrera física epitelial, y con él llegan neutrófilos de la película lagrimal a la zona de la lesión. La llegada de estos neutrófilos pone en marcha una serie de mecanismos, entre ellos la transformación de los queratocitos adyacentes a fibroblastos, y la liberación de factores de crecimiento vascular. La transformación a fibroblastos o mecanismo de cicatrización avascular, es una estrategia rápida por la cual los fibroblastos proliferan rápidamente y sintetizan colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. De esta forma el estroma corneal irá ganando espesor y desplazará anteriormente al epitelio hasta su localización fisiológica.<sup>4</sup>

Debido a que las fibrillas de colágeno que se depositan en un estroma dañado tienen mayor calibre y siguen una orientación más heterogénea, suelen asociarse a pérdida de la transparencia corneal de la zona afectada.<sup>12</sup>

### **2.3. Reparación endotelial**

Debido a la limitada o inexistente capacidad mitótica de las CECs, **la capacidad de reparación del CE se considera pobre**, tanto en el hombre como en la mayoría de las especies animales. Sin embargo, y a modo de excepción, la capacidad de proliferación de las CECs se mantiene durante toda la vida en conejos, lo cual hace que el endotelio tenga mayor capacidad de regeneración. De forma similar, las CECs de los gatos también muestran cierta actividad reparadora *in vivo*, mayor que en la mayoría de especies, aunque

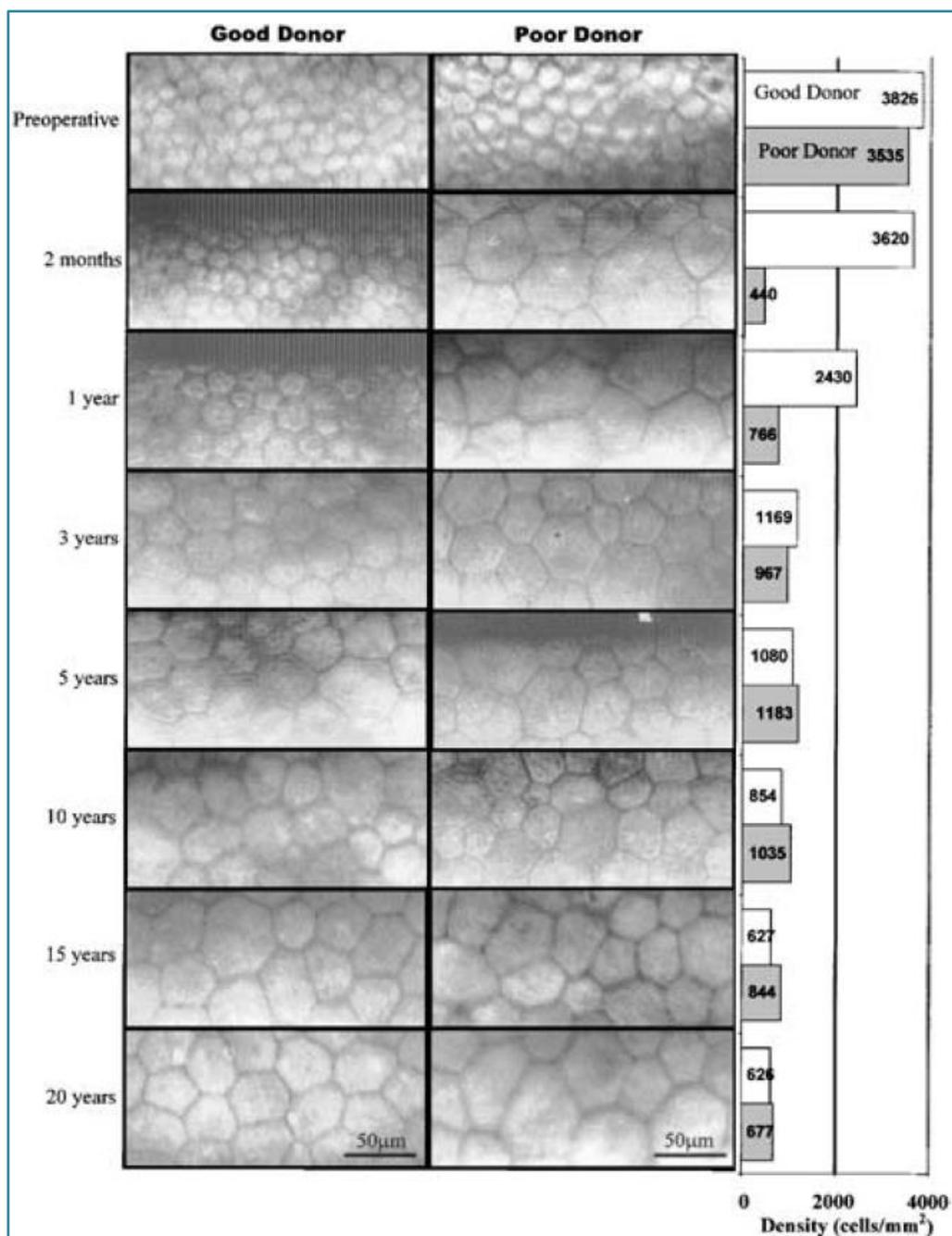
sigue siendo inferior a la de los conejos. De hecho, se considera que su endotelio es más parecido al de los humanos que al de los conejos.<sup>7,12,13,21-23</sup>

Debido a que la actividad mitótica del CE en la mayoría de especies es muy baja, las lesiones que afectan a esta capa e implican pérdida de CECs pueden resultar en daño irreversible y afectación de la función visual. En la especie humana, las CECs no se replican, manteniéndose bloqueadas en la fase G1 de su ciclo celular. Esto se debe a la inhibición celular contacto-dependiente, la falta de estimulación efectiva de factores de crecimiento y la supresión de la fase S por el *transforming growth factor-beta 2* (TGF- $\beta$ 2). Como consecuencia, aunque puede inducirse la división de las CECs en córneas cultivadas *in vitro*, se considera que el CE humano no muestra capacidad regenerativa significativa *in vivo*.<sup>3,6,11,15,22</sup>

La incapacidad de replicación de las CECs, ante un daño endotelial con pérdida de CECs, hace que las células restantes reaccionan incrementando su tamaño (**polimegatismo**, o aumento del **coeficiente de variación** (CV) de la superficie celular) y variando su forma (aumento del **pleomorfismo**, o disminución de la **hexagonalidad**), alargándose y migrando para tratar de cubrir el área afectada. Por desgracia, estas alteraciones celulares tienen como consecuencia la disminución de la capacidad del CE para regular la hidratación corneal, provocando edema corneal, disminución de la transparencia y, en casos severos, pérdida de la agudeza visual.<sup>3,6,7,21,24</sup>

La densidad media de las CECs (*endothelial cell density* (**ECD**)) varía en función de diferentes factores, tales como: **la especie animal, la edad**, y otros, tales como **traumatismos, cirugía refractiva, queratoplastia previa, estrés**

**debido a diabetes, glaucoma o distrofia endotelial, tabaquismo, o el estado hormonal.** La **especie animal** determina de forma directa la ECD siendo, por ejemplo, de 2500-3000 CECs/mm<sup>2</sup> en el conejo, de 2800-3500 CECs/mm<sup>2</sup> en el perro y de 2316-4450 CECs/mm<sup>2</sup> en personas.<sup>16,25</sup> Entre otras especies de animales vertebrados cabe destacar, a modo de curiosidad, el pez *Carassius auratus auratus*, con una ECD de 431 CECs/mm<sup>2</sup>, y el caballito de mar de Australia Occidental, *Hippocampus angustus*, con una CDE de 11133 CECs/mm<sup>2</sup>.<sup>16</sup> Con **la edad**, la ECD y el porcentaje de hexagonalidad celular disminuyen gradualmente de forma natural.<sup>3</sup> En **la especie humana**, la ECD durante el primer mes de vida es de aproximadamente 6000 CECs/mm<sup>2</sup>, a los 5 años de edad pasa a ser de 3500 CECs/mm<sup>2</sup>, para seguir disminuyendo hasta valores de 2300 CECs/mm<sup>2</sup> a los 85 años. El porcentaje de CECs hexagonales también se reduce, presentando un individuo de 20 años de edad un 75%, comparado con el 60% que vemos en personas de 80 años. Para poder mantener sus funciones y preservar la transparencia ocular, es necesario que la ECD se mantenga por encima del nivel crítico de 400-500 CECs/mm<sup>2</sup>.<sup>2,3,6,15,23</sup> Esta afirmación convierte automáticamente a la ECD en uno de los parámetros de mayor peso para la elección de donantes de córnea en personas (Fig. 13).



**Figura 13.** Imágenes de microscopía especular de la evolución de la ECD (en CECs/mm<sup>2</sup>) en dos pacientes a lo largo de 20 años tras haber recibido un trasplante corneal de un candidato óptimo ("Good donor") y otro de menor calidad ("Poor donor"). Puede observarse como, especialmente al poco tiempo tras la cirugía, hay un descenso en la ECD mucho más marcado en el paciente que recibió el trasplante corneal del candidato de menor calidad. Fuente: Bourne WM. *Biology of the corneal endothelium in health and disease.* Eye. 2003;17(8):912-918.

La edad también ha demostrado ser un parámetro de variación de la ECD en otras especies tales como **el perro, el gato, la oveja, la cabra o la chichilla.** En todas ellas se observa simultáneamente aumento del pleomorfismo y del

polimegatismo de las CECs.<sup>13,24,26,27</sup> La ECD normal en perros jóvenes es de 2800 CECs/mm<sup>2</sup>, considerándose que por debajo de 500-800 CECs/mm<sup>2</sup> se produce descompensación corneal. En algunos casos de déficit moderado o alto, las CECs restantes no son capaces de compensar la pérdida de endotelio y su función, produciéndose edema y opacidad corneal permanente.<sup>4,28</sup>

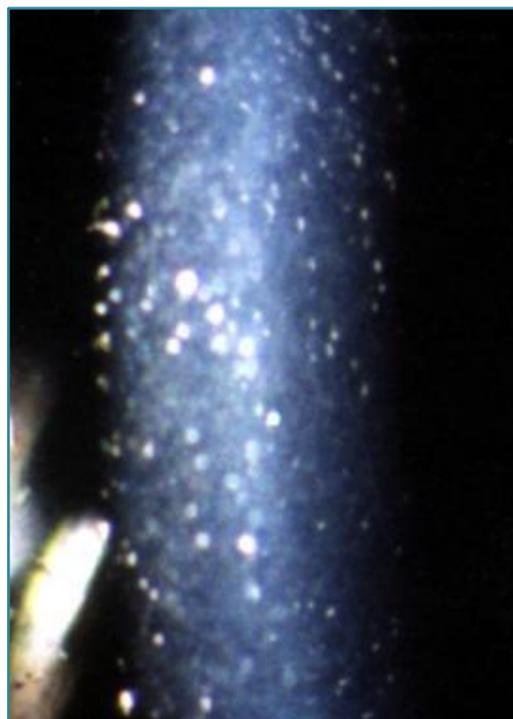
### 3. Enfermedad endotelial corneal

#### 3.1. Endoteliopatías más frecuentes

Las enfermedades endoteliales corneales en el hombre son mayormente secundarias, siendo las primarias poco frecuentes. Dentro de las **enfermedades endoteliales primarias**, las más habituales son la **Distrofia de Fuchs**, la **Distrofia Polimorfa Posterior** (*Posterior Polymorphous Dystrophy* (PPD)) y la **Distrofia Endotelial Congénita Hereditaria** (*Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy* (CHED)). Se baraja la posibilidad de que estas tres patologías puedan compartir una serie de alteraciones genéticas.<sup>7,15,29</sup>

La **Distrofia de Fuchs** es una enfermedad autosómica dominante, con predisposición por el género femenino, que provoca signos clínicos bilaterales en edad adulta. A pesar de su ampliamente conocido carácter heredable, también se ha descrito su presentación debido a mutaciones puntuales. En esta enfermedad, las CECs dejan de funcionar gradualmente provocando disminución de la ECD, pérdida de función de la barrera endotelial y finalmente pérdida de transparencia corneal. La distrofia de Fuchs cursa inicialmente con “**guttata**” o condensaciones ubicadas en la membrana de Descemet fácilmente observables mediante lámpara de hendidura (Fig. 14).

**Figura 14.** Observación de "guttata" mediante lámpara de hendidura en una mujer de 61 años con distrofia endotelial de Fuchs. Fuente: <http://emedicine.medscape.com/>



Con el tiempo la funcionalidad endotelial se verá gravemente alterada, produciendo marcado edema corneal difuso, que se asociará a fibrosis estromal y neovascularización corneal profunda. Las personas afectadas suelen, en estadios iniciales, mostrar leves alteraciones de la agudeza visual, que pueden ser, en algunos casos, difíciles de evidenciar por el afectado. Estos pacientes pueden tener vista ligeramente borrosa y dificultad para conducir en condiciones escotópicas. Como este tipo de distrofia aparece muy lentamente, los pacientes pueden no evidenciar el problema visual y por tanto no solicitar revisión oftalmológica diagnosticándose, en algunos casos, en fases más avanzadas de la enfermedad. Estas personas tendrán de moderado a marcado déficit visual, sobre todo por las mañanas, que va disminuyendo a lo largo del día, y que curiosamente suele empeorar en época húmeda o en días lluviosos. A pesar de ser una enfermedad por definición no dolorosa, algunos pacientes

pueden presentar pequeñas úlceras corneales como resultado de bullas epiteliales-estromales.

Desafortunadamente para las personas afectadas, **el único tratamiento efectivo actualmente es el trasplante corneal**. El trasplante debe proporcionar un endotelio nuevo, sano y con una ECD adecuada. En la actualidad se están desarrollando gran cantidad de técnicas quirúrgicas corneales laminares profundas. Estas técnicas restauran en su mayoría el endotelio corneal, manteniendo el resto del tejido corneal del receptor, y por lo tanto reduciendo las complicaciones y el riesgo de rechazo postoperatorio.

La **Distrofia Polimorfa Posterior** es una enfermedad que se caracteriza por presentar células endoteliales con características de células epiteliales, que incluso, en algunos casos, pueden estar estructuradas en varias capas. Las lesiones suelen desarrollarse en la infancia temprana y son mayoritariamente bilaterales, aunque pueden ser asimétricas o unilaterales en algunos casos. A pesar de su inicio temprano, la mayoría de pacientes son asintomáticos, pudiendo raramente inducir opacidad estromal, con el consecuente deterioro visual progresivo, que requiera tratamiento quirúrgico. La sospecha clínica se inicia al observar en el examen biomicroscópico opacidades disciformes, pequeñas, de color blanco grisáceo e irregulares en la membrana de Descemet y el endotelio (Fig. 15).<sup>15,29</sup>

**Figura 15.** Microfotografía especular del ojo derecho de un paciente afectado por PPD. Pueden apreciarse dos áreas donde claramente hay una afectación de la parte posterior de la córnea (flechas blancas), que contrastan con otra área en la que las CECs parecen normales (flecha negra). Fuente: Krachmer, JH. Posterior polymorphous corneal dystrophy: a disease characterized by epithelial-like endothelial cells which influence management and prognosis. *Transactions of the American Ophthalmological Society.* 1985;83:413.



La **Distrofia Endotelial Congénita Hereditaria** provoca pérdida de transparencia corneal desde el nacimiento. Es una enfermedad menos frecuente que la PPD, pero en este caso una proporción más elevada de pacientes requerirán tratamiento quirúrgico.<sup>15</sup>

Las **enfermedades endoteliales corneales secundarias** suelen ir asociadas a cirugías de cataratas o trasplante corneal, a procesos intraoculares (uveítis o glaucoma), o al uso prolongado de lentes de contacto. El desgaste que provoca el uso crónico de las lentes de contacto induce aumento del polimegatismo y del pleomorfismo de las CECs.<sup>15</sup> En el conejo no se han descrito endoteliopatías concretas que hayan sido bien caracterizadas, como en el caso de la especie humana.

### 3.2. Métodos de evaluación del endotelio

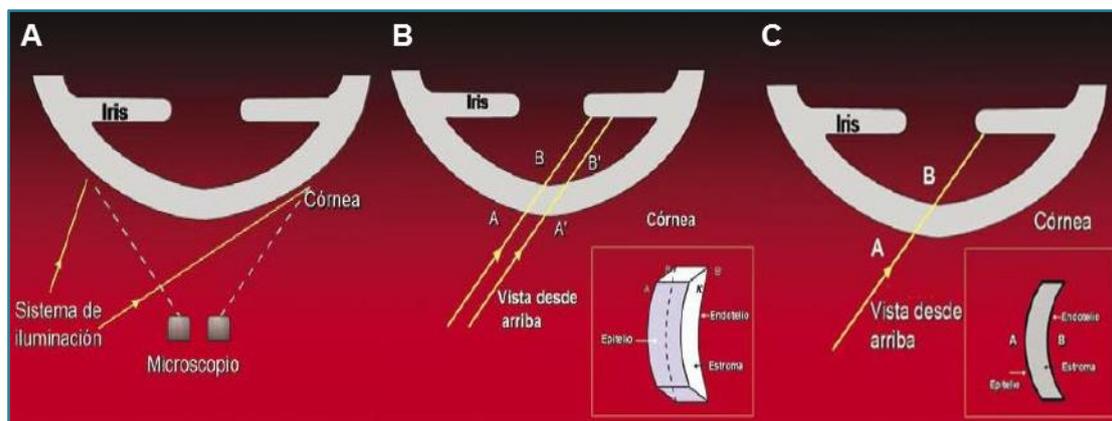
La función y estructura del CE puede evaluarse mediante diferentes métodos, que se describen a continuación.

### 3.2.1. Métodos de evaluación del endotelio in vivo

#### Exploración biomicroscópica

La exploración con lámpara de hendidura o biomicroscópica es, sin duda alguna, la primera aproximación diagnóstica en caso de sospecha de alteración del endotelio corneal. Debe realizarse en una habitación semi-oscura.<sup>30</sup> La biomicroscopía permite la observación estereoscópica, siendo de especial importancia el ajuste de la distancia interpupilar de cada observador. Este método diagnóstico, en manos de un oftalmólogo experimentado, permite detectar signos de distrofia endotelial en fases tempranas -tales como guttata u opacidades disciformes en membrana de Descemet y endotelio-, así como clasificar el grado de transparencia corneal o inflamación secundaria.<sup>30,31</sup>

La biomicroscopía permite diferentes métodos de iluminación, tales como **luz difusa** (observación general de párpados, pestañas, conjuntiva, carúncula, esclera, vasos sanguíneos, córnea, iris y pupila), **paralelepípedo** (con una hendidura ancha, de entre 1-3mm, se obtiene una imagen que permite valorar la película lagrimal, la córnea en toda su extensión, y la superficie del cristalino) y la **sección óptica** (con una hendidura de luz delgada [ $\leq 1$  mm] que hace que las paredes laterales del paralelepípedo se fusionen en un plano virtual o sección, permitiendo valorar la profundidad de cuerpos extraños o de opacidades corneales) (Fig. 16). También permite la evaluación mediante **retroiluminación**, observando las estructuras gracias a la reflexión de la luz en los tejidos más internos (principalmente el *Tapetum lucidum*).<sup>30</sup>



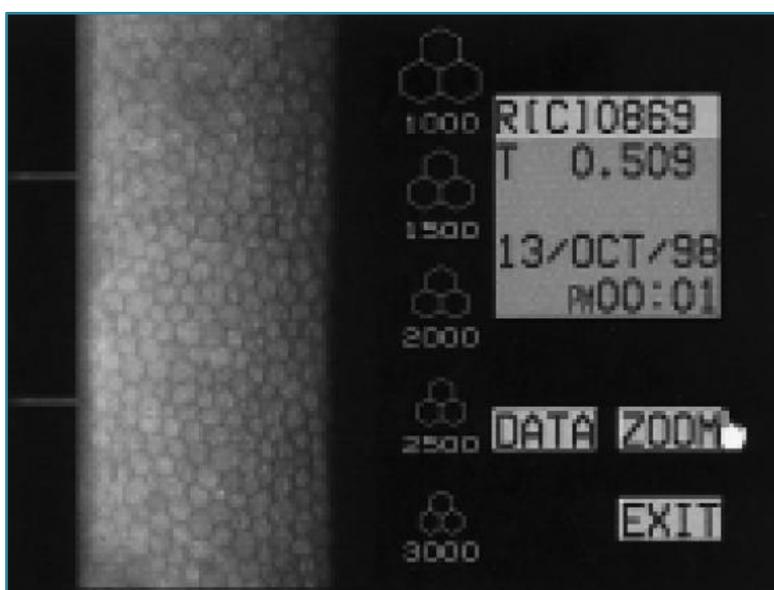
**Figura 16.** Sistemas de iluminación con lámpara de hendidura mediante luz difusa (A), paralelepípedo (B) y sección óptica (C). Fuente: <https://carolvpinzon.wordpress.com/2010/03/17/hello-world/>.

### Microscopía especular y paquimetría

El segundo paso diagnóstico a realizar ante la sospecha de enfermedad endotelial incluye paquimetría y microscopía especular, que pueden realizarse simultáneamente, con el mismo aparato. La **paquimetría** es una prueba no invasiva que determina el espesor corneal, considerado indicador indirecto de la salud corneal. Puede realizarse mediante **métodos de contacto** o **métodos de no contacto**. Los métodos de contacto, son los menos utilizados e incluye principalmente la ecografía de alta resolución; mientras que los métodos de no contacto incluyen la topografía corneal *Orbscan*, la tomografía de coherencia óptica (*Optical Coherence Tomography* (OCT)) y la paquimetría óptica.<sup>32</sup> Los diferentes tipos de paquimetría permiten determinar el grosor corneal en diversos puntos de la córnea, con buena reproducibilidad.<sup>33</sup> Los valores obtenidos permiten, no solo diagnosticar la enfermedad, sino también evaluar la respuesta a la medicación o a procedimientos quirúrgicos.

La **microscopía especular** es igualmente una prueba no invasiva que permite la caracterización morfométrica del endotelio. Mediante esta herramienta,

podemos determinar densidad y superficie de las CECs, así como el grado de pleomorfismo y polimegatismo (Fig. 17).<sup>31</sup> El microscopio especular *TOPCON Specular Microscope SP-2000P*<sup>®</sup> (Topcon, Tokyo, Japón), es uno de los aparatos que permite realizar mediciones de paquimetría y microscopía especular simultáneamente, y aportar valores de diferentes parámetros endoteliales corneales. No obstante, en córneas anormales y con marcado edema corneal, las imágenes pierden calidad y en algunos casos pueden no obtenerse datos para algunos de los parámetros.<sup>33,34</sup>



**Figura 17.** Imagen del endotelio corneal humano proporcionada por el microscopio especular TOPCON SP-2000P<sup>®</sup>. Fuente: Cheung SW, Cho P. Endothelial cells analysis with the TOPCON specular microscope SP-2000P and IMAGEnet system. *Curr Eye Res.* 2000;21(4):788-798.

La microscopía especular, en la actualidad, no solo se utiliza en la especie humana, sino también en otras especies de mamíferos. Gracias a este método diagnóstico se han establecido los valores de referencia de densidad endotelial para especies tales como: cerdos (7625 CECs/mm<sup>2</sup>), caballos (3155 CECs/mm<sup>2</sup>), llamas (2669 CECs/mm<sup>2</sup>), alpacas (2275 CECs/mm<sup>2</sup>), gatos (3625 CECs/mm<sup>2</sup>), chinchillas (2650 CECs/mm<sup>2</sup>) y ovejas (2883 CECs/mm<sup>2</sup>).<sup>24,26,27,35</sup>

## Fluorofotometría

La fluorofotometría permite estimar la función del CE en base a la permeabilidad a la fluoresceína (Fig. 18). La cuantificación del coeficiente de penetración de la fluoresceína a través de la córnea una vez aplicada por vía tópica, permite la valoración de alteraciones corneales.<sup>18,36</sup> Este método se utiliza para evaluar la función de barrera de las CECs. De hecho, se ha descrito que la permeabilidad endotelial corneal a la fluoresceína aumenta con la edad en los seres humanos.<sup>37</sup> Esta técnica permite también detectar alteraciones subclínicas en la integridad del epitelio, lo cual resulta especialmente útil en el diagnóstico de pacientes con ojo seco.<sup>36,38</sup>

$$\text{Permeability} = \frac{q_t r_{ca} [C_c(t_1) - C_c(t_0)]}{(r_{ca} \bar{C}_a - \bar{C}_c)(t_1 - t_0)}$$

**Figura 18.** Fórmula utilizada para calcular la permeabilidad endotelial a la fluoresceína, donde  $t_0$  y  $t_1$  son el tiempo al inicio y al final del intervalo;  $q_t$  es el espesor corneal medio en el intervalo;  $r_{ca}$  es el ratio de distribución de la fluoresceína entre la córnea y la cámara anterior (se asume que es 1,6);  $C_c(t)$  es la concentración de fluoresceína en la córnea en el tiempo  $t$ , y  $\bar{C}_c$  y  $\bar{C}_a$  son las concentraciones medias de fluoresceína en la córnea y en la cámara anterior en el intervalo. Fuente: Bourne WM, Hodge DO, McLaren JW. Estimation of corneal endothelial pump function in long-term contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(3):603-611.

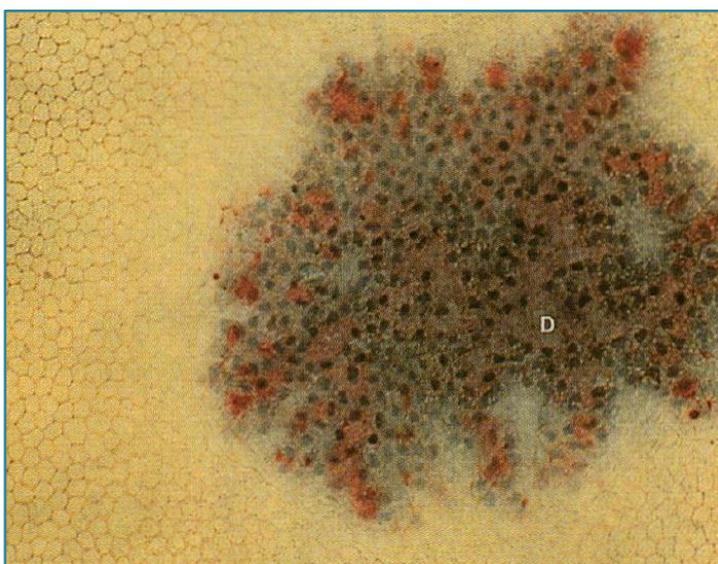
### 3.2.2. Métodos de evaluación del endotelio ex vivo

#### Tinciones vitales

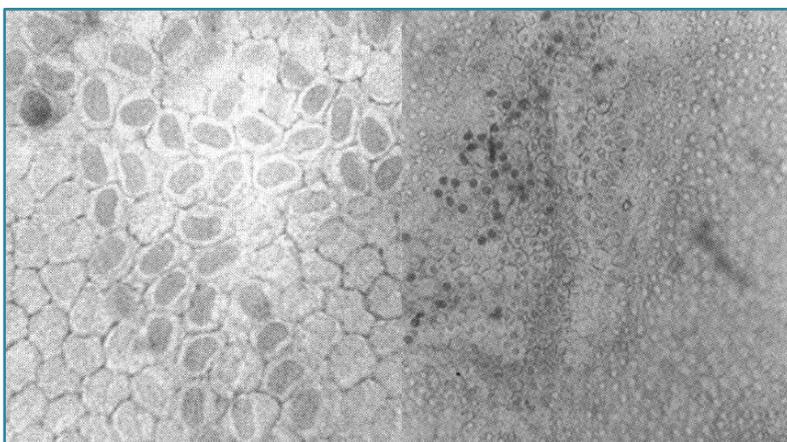
La integridad endotelial corneal también puede evaluarse *ex vivo* mediante tinciones vitales. La tinción con **azul tripán y rojo alizarina** es una técnica simple y rápida que permite visualizar las CECs bajo el microscopio óptico, evaluar su morfología y cuantificar el posible daño endotelial.<sup>39,40</sup> Descrita por primera vez por *Taylor y Hunt* en 1981, se utilizó inicialmente en córneas de conejos, cerdos y seres humanos (Figs. 19 y 20). Durante el desarrollo y puesta a punto de la técnica se prepararon soluciones de dichos colorantes en

suero salino al 0,9% y, tras varias pruebas, describieron un método que permite la visualización de los márgenes celulares gracias al rojo alizarina, y discrimina las CECs muertas de las vivas gracias al azul tripán (tiñe de azul los núcleos de las CECs muertas). Los autores resaltaron, ya en su momento, la importancia de ajustar el pH de la preparación a 4,2, con el fin de asegurar su eficacia.<sup>39</sup> Más recientemente, Park et al. modificaron ligeramente el protocolo inicial, utilizando diferentes concentraciones de colorantes y sustituyendo por PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) el diluyente inicial (suero salino fisiológico al 0,9%) (Fig. 21).<sup>40</sup>

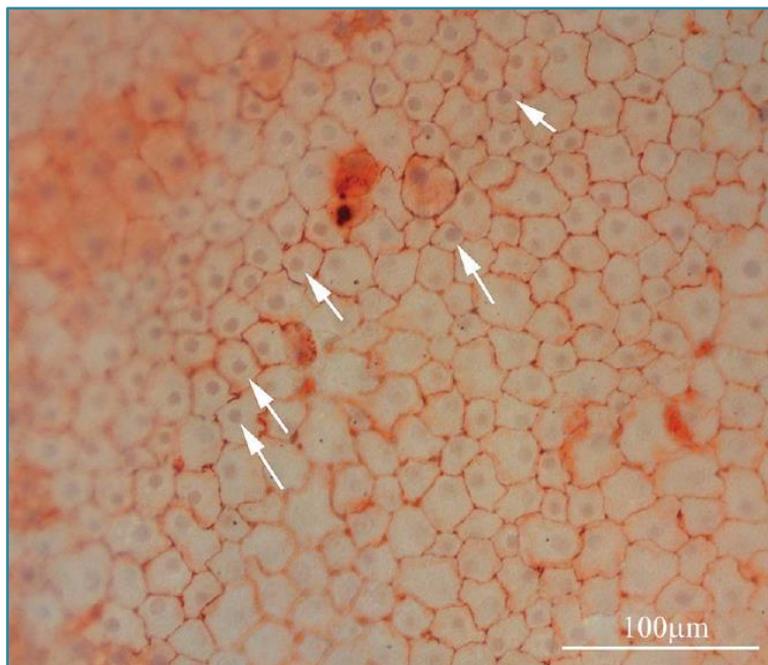
**Figura 19.** Endotelio corneal de conejo teñido mediante azul tripán y rojo alizarina según protocolo descrito por Taylor y Hunt en 1981. En el área donde ha habido una lesión, las CECs presentan la coloración azul de sus núcleos; además, puede observarse también la membrana de Descemet (D) teñida en rojo debido a la pérdida de CECs. Fuente: Taylor MJ, Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br J Ophthalmol.* 1981;65(12):815-819.



**Figura 20.** Endotelio corneal de cerdo (izquierda) y humano (derecha) teñidos mediante el protocolo de combinación de azul tripán y rojo alizarina descrito por Taylor y Hunt en 1981. En ambas, puede observarse como se tiñe el núcleo de las CECs muertas. Fuente: Taylor MJ, Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br J Ophthalmol.* 1981;65(12):815-819.



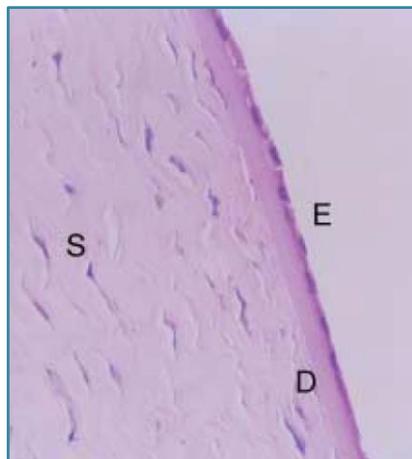
**Figura 21.** Endotelio corneal teñido con azul tripán al 0,4% y rojo alizarina al 0,5% siguiendo el protocolo descrito por Park et al. en 2012. Las flechas señalan algunas de las CECs cuyo núcleo ha quedado teñido de color azul. Fuente: Park S, Fong AG, Cho H, et al. Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. *Cornea*. 2012;31(12):1476-1479.



## Histopatología

La histopatología es una herramienta de considerable valor para evaluar el CE (Fig. 22), a pesar de que los artefactos y desprendimientos de endotelio son frecuentes en los cortes histológicos, dificultando, en algunos casos, la interpretación de los resultados.<sup>31</sup> La fijación, inclusión y realización de cortes histológicos son puntos clave en el procesamiento de la muestra, pudiendo, en caso de no realizarse correctamente, dificultar gravemente la evaluación del endotelio corneal. La tinción más utilizada es la hematoxilina-eosina.

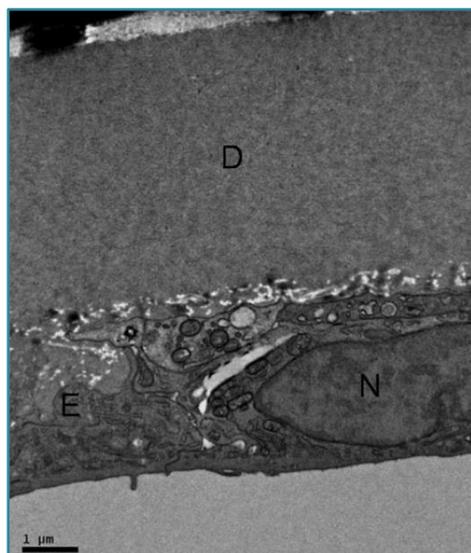
**Figura 22.** Sección histológica de una córnea canina de un individuo de 2 meses de edad teñida con hematoxilina-eosina. **S**, Estroma; **E**, Endotelio; **D**, Membrana de Descemet. Fuente: Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM, Rigueiro MP, Smith RL. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Vet Ophthalmol*. 2006;9(2):101-107.



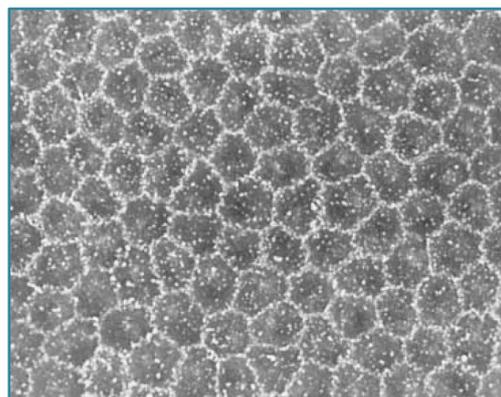
## Otros métodos de evaluación del endotelio corneal

La microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy* (TEM)) (Fig. 23) y la microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscopy* (SEM)) (Fig. 24) permiten analizar el CE a nivel ultraestructural, incluyendo las uniones intercelulares.<sup>31</sup>

**Figura 23.** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la córnea de conejo. Puede reconocerse la membrana de Descemet (D) así como una célula endotelial corneal (E) y un núcleo (N). Fuente: Chew, AC, Tan DT, Poh R, Beuerman RW & Mehta JS. Effect of intracameral injection of fibrin tissue sealant on the rabbit anterior segment. *Molecular vision*. 2010;16:1087.



**Figura 24.** Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) del endotelio de un perro de 3 meses de edad. Fuente: Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM, Rigueiro MP, Smith RL. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Vet Ophthalmol*. 2006;9(2):101-107.



### 3.3. Tratamiento actual de la enfermedad endotelial corneal

El tratamiento de las enfermedades endoteliales primarias, previamente citadas, suele abordarse en fases iniciales mediante tratamiento médico paliativo. El tratamiento quirúrgico se reserva para fases avanzadas de la

enfermedad, en las que se afecta la agudeza visual, o ante la falta de respuesta al tratamiento.<sup>3,31</sup>

Las opciones terapéuticas son múltiples, utilizándose principalmente antiinflamatorios tópicos (corticosteroides y antiinflamatorios no esteroideos) en combinación con sustancias tópicas hiperosmóticas.<sup>12</sup> De igual manera, el abordaje quirúrgico es muy variable, con técnicas quirúrgicas cada vez más depuradas y especializadas que permiten la sustitución de la capa afectada. A continuación se detallan algunas de las técnicas quirúrgicas más frecuentemente utilizadas en el hombre.

**Queratoplastia penetrante.** La queratoplastia penetrante (*full-thickness penetrating keratoplasty - PKP*), o remplazo de la córnea en todo su espesor, ha sido hasta hace pocos años la técnica quirúrgica más utilizada para el tratamiento de las enfermedades endoteliales primarias. Las principales complicaciones postquirúrgicas asociadas a esta técnica incluyen glaucoma y rechazo corneal. Este último viene dado, principalmente, por la capacidad inmunogénica de las células epiteliales y endoteliales, ya que el estroma es una capa de celularidad muy baja. Ambos tipos celulares (células epiteliales y endoteliales) pueden producir marcada reacción inflamatoria que requiera el uso de inmunosupresores/immunomoduladores para controlarse. De hecho, los pacientes operados suelen mantenerse con terapia inmunosupresora durante largos periodos de tiempo, con riesgo de complicaciones secundarias.<sup>3</sup>

Durante los últimos años se han descrito técnicas quirúrgicas menos invasivas orientadas a reducir el riesgo de rechazo mediante el trasplante específico de las capas afectadas. Estas técnicas preservan el estroma y el epitelio del receptor, reduciendo tanto las complicaciones de una incisión corneal

perforante como la carga inmunológica del tejido donante, lo que reduce la incidencia de rechazo.<sup>3</sup>

**Queratoplastia endotelial.** Las queratoplastias endoteliales son un grupo de técnicas de trasplante corneal laminar de reciente descripción, que han sufrido grandes cambios y adaptaciones durante los últimos años. Entre estas técnicas de cirugía corneal mínimamente invasivas cabe destacar, en orden cronológico la *Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty* (DLEK), la *Descemet's Stripping (Automated) Endothelial Keratoplasty* (DSEK/DSAEK), la *Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty* (DMEK) y la *Descemet's Membrane Automated Endothelial Keratoplasty* (DMAEK).

La **DLEK** fue la primera técnica de queratoplastia endotelial descrita y utilizada en la clínica oftalmológica con éxito.<sup>41</sup> En esta técnica se reemplaza el tercio posterior de la córnea, incluyendo endotelio, membrana de Descemet y estroma profundo, por tejido donante. Con el tiempo esta técnica se fue adaptando y modificando con el objetivo de trasplantar cada vez menos tejido donante, hasta llegar a la **DSEK/DSAEK**.<sup>42</sup> Estas dos técnicas trasplantan membrana de Descemet, endotelio corneal y una mínima cantidad de estroma. Finalmente se describieron la **DMEK**<sup>43</sup> y la **DMAEK**,<sup>44</sup> en las que la selección del tejido a trasplantar es mucho más específica, eliminando completamente el estromal corneal.

En general, las queratoplastias endoteliales no suponen todavía una solución definitiva para todos los pacientes afectados, pero proporcionan mejores resultados visuales, menos cicatrices y alteraciones estromales y abren la puerta al estudio de técnicas de reemplazo endotelial mediante endotelio reconstruido mediante bioingeniería.<sup>3,31,45</sup>

### 3.4. Futuros tratamientos de enfermedades endoteliales

Debido a la escasez de tejidos donantes, se han desarrollado otras técnicas de reparación del CE, algunas de ellas englobadas dentro de la disciplina de ingeniería tisular.<sup>23</sup> La **terapia celular** pretende solucionar el problema de la falta de donantes mediante el cultivo de CECs obtenidas a partir de donantes. Se ha visto que, a diferencia de lo que ocurre *in vivo*, las CECs cultivadas *in vitro* pueden superar la fase G1 y son capaces de proliferar. Debido a la dificultad técnica que supone restituir una monocapa de células, se ha estudiado la posible utilización de biomateriales como colágeno, membrana amniótica, polímeros biodegradables, gelatina y matriz corneal porcina como soporte.<sup>3,46-48</sup> También se ha considerado la utilización de **células madre**, pudiendo ser **de origen endotelial**<sup>49,50</sup> o **del tejido adiposo, médula ósea o sangre de cordón umbilical**<sup>3,50-52</sup>. La obtención de las células endoteliales es complicado, siendo necesario extraerlas de la región entre el CE y la red trabecular, mientras que la obtención de los otros orígenes es más sencilla, las células son más fáciles de cultivar y presenta menos problemas éticos, al ser más sencillo conseguirlas del mismo paciente.

Uno de los puntos clave en el éxito de los trasplantes de CECs cultivadas es la adhesión al estroma corneal. En esta línea de investigación, se han utilizado diferentes productos para favorecer la adhesión, entre ellos los **inhibidores de la Rho quinasa (ROCK)**. Estos inhibidores han demostrado mejorar los resultados de los trasplantes de CECs cultivadas, promoviendo su adhesión, aumentando la capacidad de proliferación e inhibiendo su apoptosis. Por lo tanto, los inhibidores de la ROCK permitirían convertir CECs sin capacidad de proliferación en un fenotipo con capacidad de regeneración *in vivo*.<sup>53</sup> Ya se ha

demostrado su eficacia en conejos y monos y se está estudiando la utilidad de desarrollar terapias tópicas con productos que incluyan inhibidores de la ROCK.<sup>54</sup>

#### **4. Modelos actuales de enfermedad endotelial corneal**

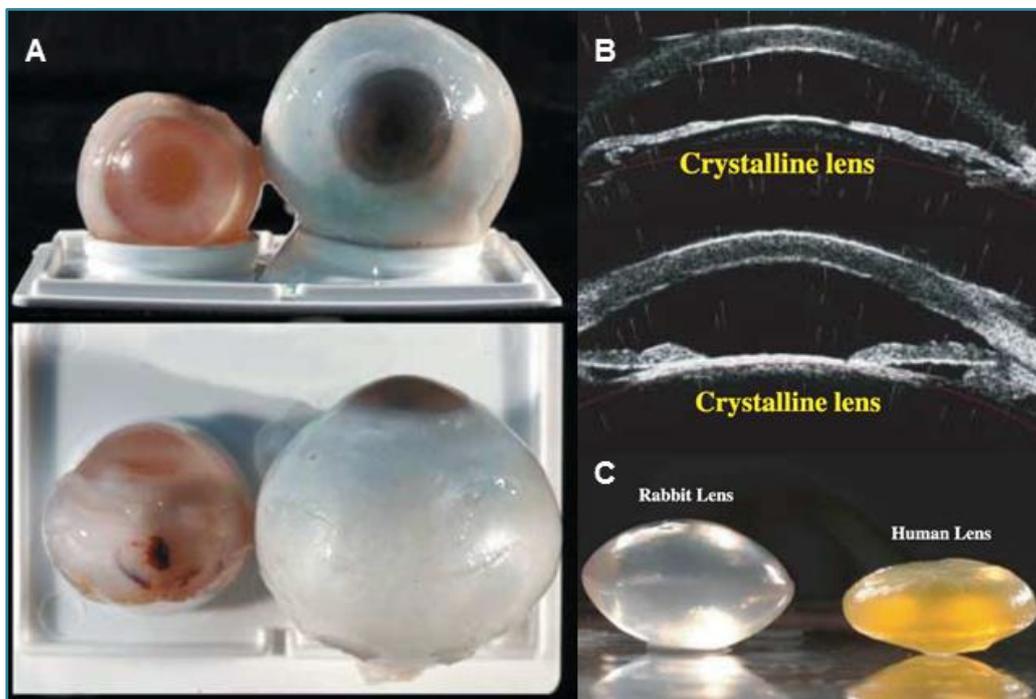
Para verificar la eficacia de las opciones terapéuticas actualmente en desarrollo, es necesaria la realización de ensayos pre-clínicos y la utilización de **modelos animales** previamente a su aplicación en pacientes reales. El modelo animal ideal para estudiar la eficacia y seguridad de nuevas técnicas de reparación endotelial en desarrollo debería ser lo más parecido posible a la especie final a la cual va destinada la terapia en cuestión.<sup>55</sup>

Pese a representar un buen modelo, por tener características anatómicas y fisiológicas parecidas al ser humano, el **cerdo** es un animal de difícil manejo. Utilizar **gatos** o **monos** podría ser una opción, pero resulta complicado debido a problemas de disponibilidad y costes de adquisición y mantenimiento. El principal inconveniente de utilizar **pequeños roedores** para investigación en cirugía corneal es el reducido tamaño de sus ojos, lo cual dificulta trabajar con ellos y hace difícil poder extrapolar los resultados a otras especies.<sup>31</sup>

El **conejo** es una especie ampliamente utilizada en investigación, incluyendo la oftalmología. Esto se debe principalmente a las facilidades para adquirir sujetos para estudios, su reducido coste, pequeño tamaño y facilidad de manejo.<sup>31,56,57</sup>

A pesar de que el tamaño del ojo de conejo es en general más pequeño que el del ser humano, las dimensiones del segmento anterior son generalmente mayores que las de las personas. Además, el cristalino de los conejos suele

ser de mayor tamaño y espesor, lo cual da lugar a que la cámara anterior sea menos profunda (Fig. 25).<sup>56</sup>



**Figura 25.** Imágenes comparativas de varios elementos del ojo de conejo y del ser humano. **A**, Globo ocular de conejo (izquierda) y de humano (derecha); **B**, Imagen ecográfica que muestra como la cámara anterior del conejo (arriba) es menos profunda que la del ser humano (abajo); **C**, Cristalino de conejo (izquierda – Rabbit lens) de mayor tamaño que el del ser humano (derecha – Human lens). Fuente: modificado a partir de Werner L, Chew J, Mamalis N. Experimental evaluation of ophthalmic devices and solutions using rabbit models. *Vet Ophthalmol.* 2006;9(5):281-291.

A diferencia de las personas, las especies animales frecuentemente utilizadas con fines de investigación para enfermedades corneales –tales como el gato o el conejo– tienen cierta capacidad mitótica endotelial,<sup>21,58</sup> lo que, por el momento, los descarta como opción de modelo animal para enfermedad corneal endotelial. La destrucción selectiva del CE en estas especies podría ayudar a inducir un modelo animal adecuado.

Se han descrito varias técnicas para inducir la destrucción intencionada del CE, entre ellas cabe destacar: **congelación transcorneal** desde la superficie epitelial, **abrasión del endotelio (desbridamiento endotelial)**, y **aplicación de productos tóxicos** para el CE (Tabla 1).

**Tabla 1.** Estudios enfocados al desarrollo de modelos animales in vivo de enfermedad endotelial corneal.

<b>Publicación</b>	<b>Método y especie</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Resultados</b>
<b>Van Horn et al., 1977</b> <sup>21</sup>	Congelación transcorneal en gatos y conejos.	Destrucción del 10, 50 y 90% de las CECs mediante crioaplicación. Evaluaciones: espesor corneal, SEM, TEM y análisis radiográfico.	Mayor regeneración del CE en conejos que en gatos. Alteraciones en CE, pero la estructura vuelve a recuperarse a los 10 días y el espesor corneal a los 28 días.
<b>Minkowski et al., 1984</b> <sup>25</sup>	Congelación transcorneal en conejos.	Destrucción del CE mediante crioaplicación. Evaluaciones: microscopía especular, fluorofotometría, paquimetría y SEM.	Alteraciones sobre el CE. La morfología de las CECs y la permeabilidad a la fluoresceína vuelven a ser normales a las 2 semanas, y el espesor corneal se normaliza a las 3 semanas.
<b>Koizumi et al., 2012</b> <sup>59</sup>	Desbridado mecánico del CE en monos.	Raspado intenso del CE desde cámara anterior y posterior tinción de la membrana de Descemet con azul tripán.	Se consigue eliminar el endotelio y sirve de modelo de disfunción endotelial para estudiar técnicas de trasplantes. A largo plazo, supuesta capacidad de recuperación del CE.
<b>Song et al., 2012</b> <sup>57</sup>	ICI de ortoftalaldehído en conejos.	ICI de 0,1ml de ortoftalaldehído diluido en BSS. Evaluaciones: paquimetría, histopatología	Incremento de edema corneal severo y aumento marcado de espesor corneal a las 12h post-ICI. No hay datos de cambios posteriores.

La **congelación transcorneal** con nitrógeno líquido es un procedimiento que resulta efectivo para inducir la destrucción del CE. Sin embargo, en conejos, incluso destruyendo el 50% de la córnea, ésta es capaz de recuperarse por completo a los 10 días de la agresión, gracias a la división celular y migración de CECs.<sup>5,21,25</sup>

El **desbridamiento endotelial** mediante raspado mecánico del CE utilizando una aguja de 20G, se ha descrito en monos y conejos, pero lamentablemente se observa recuperación endotelial unos días tras la agresión inicial.<sup>46,53,60</sup>

Las técnicas descritas previamente no son selectivas, afectando también a otras estructuras además del endotelio, y/o inducen lesiones endoteliales temporales. De ahí la necesidad de buscar otras alternativas para conseguir el modelo animal adecuado, tales como la **aplicación de agentes tóxicos** que

afecten de forma selectiva al CE. Siguiendo esta línea de investigación, en 2012, Song et al. describieron un **modelo animal de síndrome de toxicidad del segmento anterior** (*toxic anterior segment syndrome – TASS*) en conejos, inyectando 0,1 ml de una solución al 0,14% de ortoftalaldehído en cámara anterior. Según los autores, este modelo replica la toxicidad que producen determinadas sustancias tóxicas en cámara anterior, pero lamentablemente no se estudiaron sus efectos directos sobre el endotelio corneal, no pudiéndose proponer como modelo de enfermedad endotelial.<sup>57</sup>

Estudios esporádicos sobre la toxicidad intraocular de productos de uso intracameral, tales como aloxano,<sup>61</sup> peróxido de hidrógeno,<sup>62,63</sup> mitomicina, 5-fluouracilo,<sup>64,65</sup> lidocaína,<sup>66</sup> y gentamicina,<sup>67</sup> no sugieren la formación de un modelo animal, ya que induce efectos secundarios tales como: desarrollo de vascularización corneal,<sup>61</sup> aumento del espesor corneal y efecto oxidativo excesivos,<sup>62,63</sup> perspectivas de toxicidad insuficiente *in vivo*,<sup>64</sup> o falta de acción inmediata.<sup>65</sup>

## 5. Toxicidad del cloruro de benzalconio

El **cloruro de benzalconio** (*benzalkonium chloride (BAC)*) es el conservante más frecuentemente utilizado en preparaciones oftálmicas, especialmente para el tratamiento de glaucoma. Es un amonio cuaternario que, empleado en formulaciones, habitualmente a concentraciones entre 0,004% y 0,025%, ejerce actividad antimicrobiana destruyendo las membranas celulares de las bacterias. Por desgracia, su acción es poco selectiva y su uso por vía tópica

puede causar problemas tales como ojo seco, sensación de cuerpo extraño, lagrimeo o picor en los párpados.<sup>28,68–73</sup>

La toxicidad ocular del BAC se ha caracterizado mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* en diferentes especies, incluyendo el conejo y el hombre (Tabla 2). Estos estudios sugieren que el BAC tiene efecto tóxico dosis-dependiente sobre la córnea, tanto por vía tópica como por vía intraocular, **afectando especialmente al endotelio**. Estas publicaciones también concluyen que el BAC a las concentraciones utilizadas habitualmente por vía tópica no debería ser aplicado por vía intraocular debido a su elevada toxicidad.<sup>60,70,72–86</sup> De hecho, el uso intraocular de viscoelásticos formulados con BAC como excipiente, se ha asociado a lesiones corneales endoteliales.<sup>80</sup>

**Tabla 2.** Selección de estudios evaluando el efecto de BAC como excipiente.

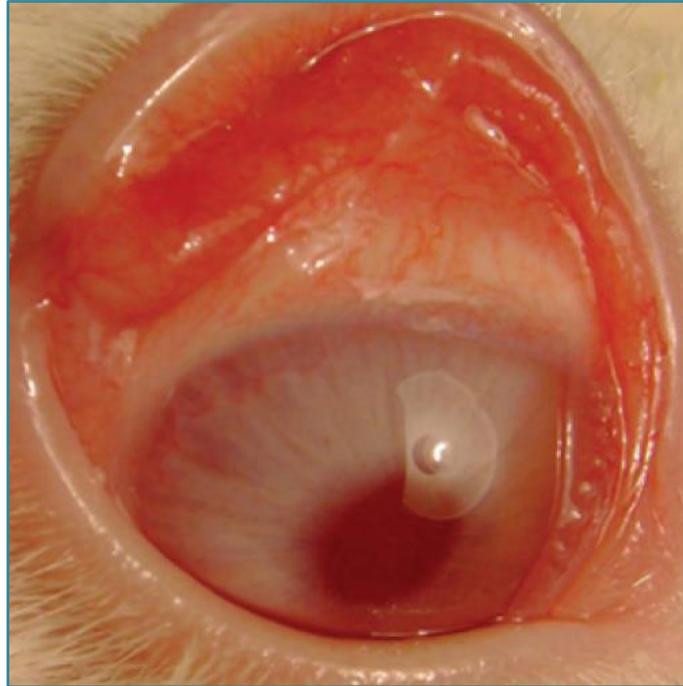
<b>Publicación</b>	<b>Método y especie</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Resultados</b>
<b>Swan et al., 1944</b> <sup>81</sup>	ICI de BAC en conejos.	ICI de BAC al 0,001, 0,025 y 0,05% en solución de NaCl al 0,68%. Sistema de jeringas con 2 agujas en cámara anterior; una para inyectar compuestos y otra para extraer misma cantidad de humor acuoso. Evaluaciones: biomicroscopía.	Endotelio más grueso y grisáceo tras ICI de BAC al 0,025 y 0,05%. Además, alteraciones en iris y presencia de fibrina en cámara anterior y vascularización corneal.
<b>Britton et al., 1976</b> <sup>87</sup>	ICI de BAC en conejos.	ICI de 0,25ml BAC al 0,001, 0,005, 0,01, 0,03, 0,05 y 0,1% en SSF. Evaluaciones mediante biomicroscopía y paquimetría.	Varias alteraciones oculares (conjuntiva, iris) incluyendo in incremento del espesor corneal.
<b>Maurice et al., 1977</b> <sup>60</sup>	ICI de BAC en conejos.	ICI de 2,5ml BAC al 0,05, mediante sistema de jeringas, combinando con suero salino al 0,9% y gentamicina. Evaluaciones: Biomicroscopía, IOP, SEM e histopatología	Aumento de espesor, edema y curvatura corneales, así como disminución de la IOP.
<b>Green et al., 1977</b> <sup>69</sup>	BAC tópico en conejos.	Tras eliminar el epitelio con una espátula, aplicación repetida de BAC al 0,02 o 0,133% 5 veces en intervalos de 7 min. Evaluaciones: microscopía especular y SEM.	No se produjo ninguna alteración en el CE a ninguna dosis.
<b>Ichijima et al., 1992</b> <sup>70</sup>	BAC tópico en conejos.	Aplicación repetida de BAC al 0,005, 0,01 o 0,02% 5 veces en intervalos de 7 min. Evaluaciones: TSCM y SEM.	Alteraciones sobre el epitelio, pero no en el CE.
<b>Chen et al., 2011</b> <sup>73</sup>	BAC tópico en conejos.	Aplicación repetida de BAC al 0,01, 0,05 o 0,1% 2 veces al día durante 4 días. Evaluaciones: microscopía confocal y permeabilidad a la carboxifluoresceína.	La aplicación tópica de BAC al 0,1% provoca alteraciones en el CE al aumentar su permeabilidad a la carboxifluoresceína.

Siguiendo en esta línea argumental, en 1944 un estudio en conejos reportó daño corneal irreversible al aplicarse **BAC por vía intraocular** a altas concentraciones. Se vio que los ojos tratados eran generalmente capaces de recuperarse tras la inyección de BAC en cámara anterior a una concentración de 0,01% (dentro del rango de concentraciones habituales en las preparaciones oftálmicas), mientras que BAC al 0,05% (por encima de las concentraciones habituales) provocaba serias secuelas y el daño ocular resultaba irreversible.<sup>81</sup> Varios años más tarde, un estudio en conejos observó un efecto dosis-dependiente del BAC sobre la córnea, definiendo 0,01% como la máxima concentración de BAC que podía utilizarse por vía intracameral sin peligro alguno para las estructuras oculares.<sup>87</sup>

La **toxicidad del BAC por vía tópica** también se ha estudiado ampliamente en diferentes especies, tales como ratas, conejos (Fig. 26) y el hombre. Los estudios en ambas especies animales demuestran que el BAC provoca efectos tóxicos dosis-dependientes, tales como: alteraciones de la superficie conjuntival (quemosis, congestión), disminución de la producción de lágrima, erosiones e infiltrado celular epitelial, alteraciones estromales (neovascularización corneal, infiltrado inflamatorio estromal), y leves alteraciones endoteliales. Los autores de estos estudios recomiendan la utilización de medicamentos que no incluyan BAC como conservante en su composición, en la medida de lo posible.<sup>60,69,70,73,83,84</sup> El uso **de BAC tópico a altas concentraciones en conejos** se ha asociado a importantes cambios sobre la córnea y la conjuntiva, provocando pérdida de células globosas y disminución de la producción de lágrima basal reduciendo los valores del test de Schirmer.<sup>72</sup> Su efecto sobre el endotelio corneal en esta especie es controvertido, pues algunos estudios

confirman que no hay afección,<sup>72</sup> mientras que otros, a la misma concentración, posología y duración de tratamiento, sí que la observan.<sup>73</sup>

**Figura 26.** Aspecto del ojo de un conejo tras la aplicación tópica de BAC al 0,02% 15 veces en intervalos de 5 minutos. Fuente: Liang H, Baudouin C, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Conjunctival and corneal reactions in rabbits following short-and repeated exposure to preservative-free tafluprost, commercially available latanoprost and 0.02% benzalkonium chloride. *Br J Ophthalmol.* 2008;92(9):1275-1282.



---

# HIPÓTESIS

---



## ***1. Hipótesis principal***

- La inyección intracameral de una determinada dosis de BAC en conejos tiene un efecto tóxico que permite la destrucción selectiva del CE, lo cual permitiría inducir un modelo animal de enfermedad endotelial corneal.

## ***2. Hipótesis secundarias***

Como resultado del efecto tóxico del BAC sobre el CE:

- Se establece una relación directamente proporcional entre la concentración de BAC inyectada en cámara anterior y el espesor corneal, la superficie media de las CECs y la mortalidad celular.
- Se establece una relación inversamente proporcional entre la concentración de BAC inyectada en cámara anterior, y la densidad y la hexagonalidad de las CECs.



---

# OBJETIVOS

---



## ***1. Objetivo principal***

Hallar la dosis de BAC que, inyectada por vía intracameral en conejos, provoque daño selectivo sobre el CE sin afectar al resto de estructuras intraoculares, y sirva así para inducir un modelo animal repetible y reproducible de enfermedad endotelial corneal.

## ***2. Objetivo secundario***

Evaluar el daño producido sobre el CE tras la inyección intracameral de cloruro de benzalconio en conejos, mediante biomicroscopía, paquimetría, microscopía especular, tinciones vitales e histopatología.



---

# **ESTUDIO *ex vivo***

---



## **1. Material y Métodos**

### **1.1. Instalaciones**

La parte experimental del estudio *ex vivo* se llevó a cabo en las instalaciones del *Servei d'Oftalmologia* de la *Facultat de Veterinària* de la *Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)*.

### **1.2. Ojos**

Los 40 ojos utilizados para el estudio *ex vivo* fueron obtenidos *post-mortem* en dos mataderos (*Escorxador Industrial de Conills J. Grau SL*, Calaf, Barcelona y *Mularcun SL*, Xert, Castellón) a partir de 20 conejos adultos de unos 2-3 kg de peso vivo, de ambos sexos y de las razas Neozelandés, cruce de Neozelandés con California y Neozelandés con conejo Europeo.

Los ojos se obtuvieron inmediatamente tras el sacrificio mediante enucleación subconjuntival y se transportaron en cámaras de frío a las instalaciones de la *UAB*.

### **1.3. Productos**

Para la realización del estudio *ex vivo*, se utilizaron los siguientes productos:

- **BAC**
- Solución salina balanceada (*balanced saline solution (BSS)*: *BSS sterile irrigation solution*, Laboratoris Alcon, el Masnou, Barcelona, Spain).

Las preparaciones de BAC a las diferentes concentraciones necesarias para el estudio se prepararon de forma estéril en la *Farmàcia Xalabarder*, Barcelona.

## **1.4. Diseño experimental**

### **1.4.1. Evaluación prequirúrgica**

Antes de las 6 horas tras la enucleación se realizó la evaluación prequirúrgica, que incluyó: **biomicroscopía, paquimetría y microscopía especular**.

#### ➤ **Exploración oftalmológica mediante biomicroscopía**

El estudio biomicroscópico se llevó a cabo en condiciones escotópicas, mediante lámpara de hendidura (*SL-15 Portable Slit-Lamp Biomicroscope*<sup>®</sup>, Kowa Co. Ltd., Tokyo, Japan). La biomicroscopía se centró en el examen de la córnea y el segmento anterior, y permitió excluir del estudio aquellos ojos que mostraron evidencias de enfermedad corneal y/o del segmento anterior. El grado de edema corneal inicial se cuantificó de 0 (ausencia de edema corneal) a +4 (edema corneal severo).

#### ➤ **Paquimetría y microscopía especular**

Para las mediciones de paquimetría y microscopía especular, los ojos se colocaron en un soporte de metacrilato para facilitar su sujeción y posicionamiento. Mediante el microscopio especular (*Specular Microscope SP-2000P*<sup>®</sup>, Topcon, Tokyo, Japón) (Fig. 27) en modo automático y utilizando una distancia focal de 25 mm, se capturaron 3 imágenes de la parte central de la córnea de cada ojo. Estas imágenes sirvieron, en cada caso, para observar las CECs y seleccionar 30 de ellas que estuvieran bien definidas. A partir de esta selección, el microscopio proporcionó los cálculos de valores para los parámetros utilizados en el estudio:

- **Superficie celular media** (*mean cell area (MCA)*); expresada en  $\mu\text{m}^2$ .
- **ECD**; expresada en número de CECs/ $\text{mm}^2$ .

El mismo microscopio especular, al disponer de un paquímetro digital, proporcionó simultáneamente los valores del otro parámetro del estudio:

- **Espesor corneal** (*central corneal thickness (CCT)*); expresado en  $\mu\text{m}$ .



**Figura 27.** Imágenes del microscopio especular TOPCON Specular Microscope SP-2000P® (Topcon, Tokyo, Japón) utilizado para el estudio.

#### 1.4.2. Inyecciones intracamerales

Los ojos seleccionados tras la evaluación pre-quirúrgica fueron clasificados en **8 grupos de estudio** (5 ojos por grupo), en función de la sustancia a inyectar:

- **Grupo Control:** sin inyección de sustancia.
- **Grupo BSS:** inyección intracameral (*intracameral injection (ICI)*) de 0,1 ml de BSS.
- **Grupo 0,005% BAC:** ICI de 0,1 ml de BAC al 0,005%.
- **Grupo 0,01% BAC:** ICI de 0,1 ml de BAC al 0,01%.
- **Grupo 0,025% BAC:** ICI de 0,1 ml de BAC al 0,025%.

- **Grupo 0,05% BAC:** ICI de 0,1 ml de BAC al 0,05%.
- **Grupo 0,1% BAC:** ICI de 0,1 ml de BAC al 0,1%.
- **Grupo 0,2% BAC:** ICI de 0,1 ml de BAC al 0,2%.

Todas las ICI fueron realizadas por el mismo investigador en el limbo esclerocorneal utilizando una aguja de 27G, y con la ayuda de gafas lupa (gafas lupa 4x, Zeiss, Alemania) (Fig. 28). Tras la paracentesis, se dejaron salir una o dos gotas de humor acuoso e inmediatamente después, se inyectó 0,1 ml en cámara anterior del compuesto apropiado en cada caso. A continuación, se aplicó presión con pinzas conjuntivales durante 20 segundos, con el fin de evitar la pérdida excesiva de humor acuoso.

**Figura 28.** Técnica de inyección intracameral en el limbo esclerocorneal, mediante una aguja de 27G, empleada en este estudio.



### **1.4.3. Seguimiento**

A las 6, 24 y 48 horas post-ICI, se realizó nuevamente el examen biomicroscópico de los ojos, así como la paquimetría y la microscopía especular. Los ojos fueron conservados en refrigeración a 4°C durante todo el estudio.

#### **1.4.4. Tinciones vitales**

Una vez finalizadas las evaluaciones del último control de seguimiento a las 48 horas post-ICI, se procedió a la preparación de las córneas para las tinciones vitales. Para ello, se utilizaron los siguientes colorantes vitales:

- **Azul tripán** (*Trypan blue powder*, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri).
- **Rojo alizarina** (*Alizarin red S powder*, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri).
- **Suero salino fisiológico** (NaCl al 0,9%).

Se diseccionó la córnea en 360°, incluyendo un anillo escleral de 2-3 mm, y se colocó sobre un soporte de teflón con la cara endotelial hacia arriba. Una vez posicionada la córnea, se procedió a la tinción siguiendo el método descrito por Taylor y Hunt.<sup>39</sup>

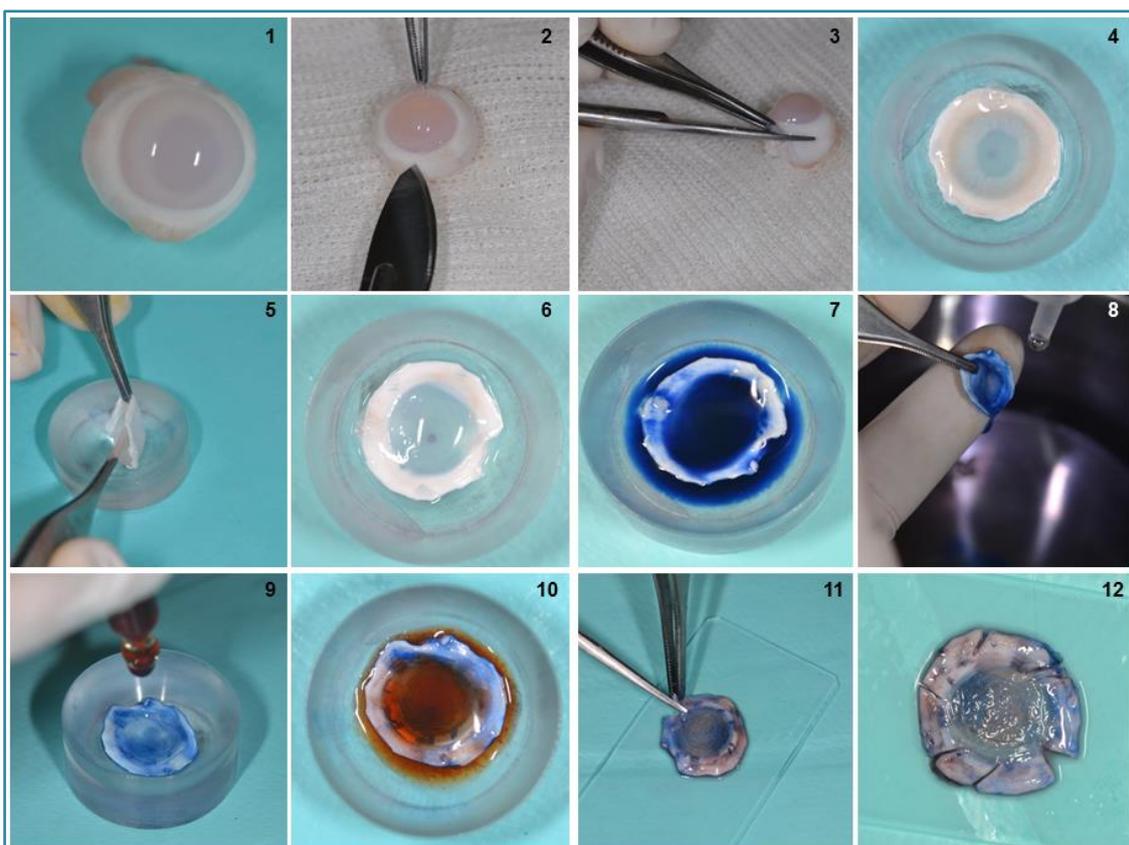
#### **Preparación de las tinciones:**

1. Ajustar el pH del suero salino a 4,2.
2. Preparación del azul tripán al 0,25%: dilución de 0,025 mg de azul tripán en polvo en 10 ml de suero salino fisiológico al 0,9%.
3. Preparación del rojo alizarina al 0,2%: dilución de 0,02 mg de rojo alizarina en polvo en 10 ml de suero salino fisiológico al 0,9%.

#### **Procedimiento de tinción (Fig. 29):**

1. Cubrir el endotelio aplicando la preparación de azul tripán gota a gota y dejarlo actuar durante 90 segundos.
2. Lavar con suero salino fisiológico al 0,9%, aplicándolo con una jeringa, y eliminar el exceso de colorante.

3. Cubrir el endotelio aplicando rojo alizarina gota a gota y dejarlo actuar durante 120 segundos.
4. Lavar con suero salino fisiológico al 0,9%, aplicándolo con una jeringa, y eliminar el exceso de colorante.



**Figura 29.** Procedimiento de tinciones vitales previa a la observación bajo el microscopio óptico. **1.** Globo ocular de conejo; **2.** Incisión con hoja de bisturí a unos 2-3 mm de distancia aproximadamente del limbo esclerocorneal; **3.** Corte de esclera circular para separar la córnea; **4.** Córnea posicionada sobre el soporte con la cara endotelial hacia arriba; **5.** Utilización de pinzas para separar el iris y cuerpo ciliar; **6.** Córnea con la cara endotelial hacia arriba, tras la extracción de iris y cuerpo ciliar, preparada para la tinción; **7.** Aplicación de azul tripán; **8.** Lavado con suero salino al 0,9%; **9.** Aplicación de rojo alizarina; **10.** Aspecto de la córnea una vez aplicado el rojo alizarina; **11.** Realización incisiones radiales **12.** Aspecto de la córnea una vez teñida y preparada para ser evaluada bajo el microscopio.

Tras el procedimiento de tinción, se realizaron varias incisiones radiales en cada muestra con el fin de aplanar la córnea antes de la evaluación microscópica. Las córneas teñidas se observaron al microscopio óptico (*Motic*<sup>®</sup> BA210, Motic Grupo, España) a 10 y 40 aumentos.

Para cada muestra, se tomaron tres fotografías de la córnea (*Nikon Eclipse TE 2000*<sup>®</sup>, Nikon Corporation, Japón) que se procesaron con un software de análisis de imágenes (*Image J*<sup>®</sup>, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland, EEUU) para obtener la tasa de **mortalidad** –clasificada como baja (0-33%), media (34-66%) o alta (67-100%)– y el grado de **pleomorfismo** (basado en el porcentaje de CECs hexagonales, o **hexagonalidad**).

#### **1.4.5. Análisis estadístico**

Por tratarse de una primera aproximación a un nuevo modelo animal experimental, no se realizó cálculo formal del tamaño de la muestra previo al inicio del estudio. Se consideró que un tamaño de 5 ojos por grupo sería suficiente para la obtención de datos estadísticamente significativos.

Los resultados se describieron con métodos estadísticos habituales y tabulados por grupo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con IBM SPSS (versión 20, Armonk, Nueva York, EEUU) y el nivel de significación alfa se fijó en 0,05.

Las **variables categóricas y ordinales** se expresaron en forma de frecuencias absolutas y porcentajes. En el caso de las **variables continuas**, se utilizaron medias con desviación estándar (*standard deviation* (SD)) y de rango (mínimo, máximo). Los porcentajes de **hexagonalidad y mortalidad** 48 horas después de la inyección se evaluaron mediante ANOVA (*Analysis of variance*) de una vía. La comparación del número de casos por grupo clasificados con un porcentaje bajo, medio o alto de **CECs muertas** fue realizada con ANOVA de una vía con un enfoque no paramétrico mediante transformación de rangos de medias.

El análisis para la **evaluación longitudinal** se realizó con un enfoque de estimación de ecuaciones generalizado (*Generalized Estimating Equations* (GEE)) con una estimación de correlación intra-sujeto a partir de un enfoque autorregresivo 1 [AR(1)]. La estimación de los efectos según el grupo se expresó en forma de medias estimadas y su error estándar (*standard error* (SE)).

## 2. Resultados

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos Control y BSS para ninguno de los parámetros estudiados, por lo que se dedujo que el procedimiento de inyección en la cámara anterior, no alteraba el endotelio corneal, y se consideró el grupo BSS como **grupo de Comparación** para el estudio.

### 2.1. Biomicroscopía

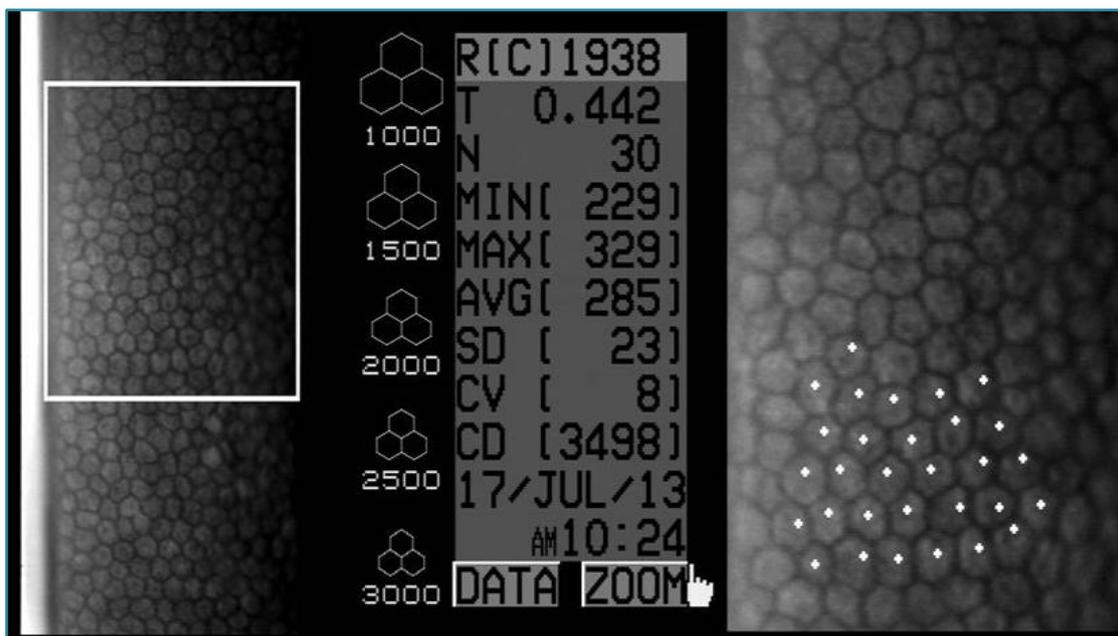
El **grado de edema corneal aumentó significativamente** en los grupos 0,005%, 0,01%, 0,025%, 0,05%, 0,1% y 0,2% BAC en comparación con el grupo BSS ( $p < 0,001$ ) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Grado de edema corneal después de la ICI ex vivo de diferentes concentraciones de BAC, comparado con BSS. [0: no edema; +1: edema corneal leve; +2: edema corneal moderado; +3 edema corneal severo; +4: edema corneal muy severo].

	<b>Edema corneal 0h</b>	<b>Edema corneal 6h</b>	<b>Edema corneal 24h</b>	<b>Edema corneal 48h</b>
Grupo BSS	0	0	+2	+2
0,005% BAC	0	0	+1	+1
0,01% BAC	0	0	+1	+1
0,025% BAC	0	+1	+1	+1
0,05% BAC	0	+2	+3	+3
0,1% BAC	0	+1	+3	+3
0,2% BAC	0	+3	+4	+4

## 2.2. Microscopía especular y paquimetría

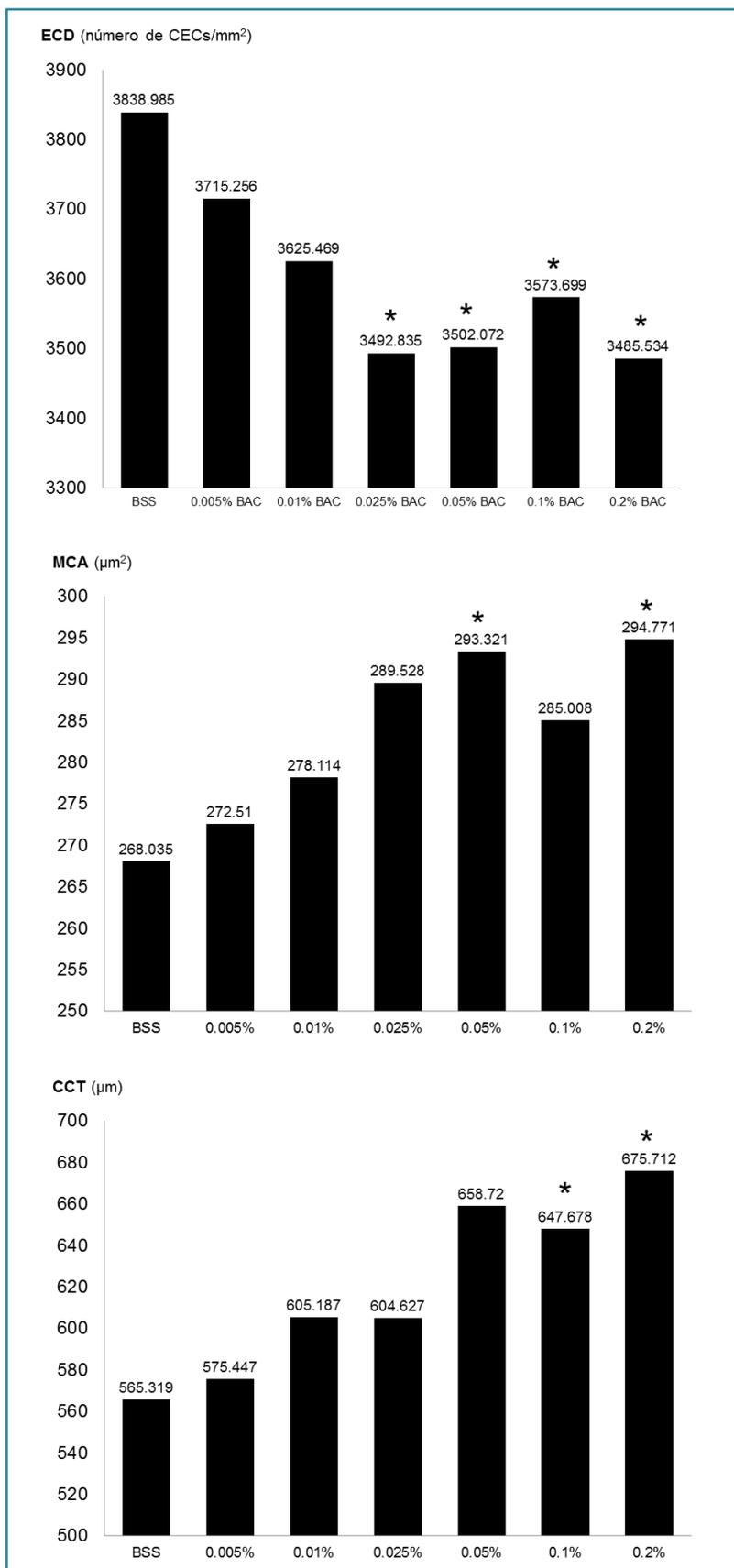
El microscopio especular permitió observar el CE, obtener valores de ECD, MCA y CCT, y facilitar el estudio estadístico de todas la muestras (Fig. 30).



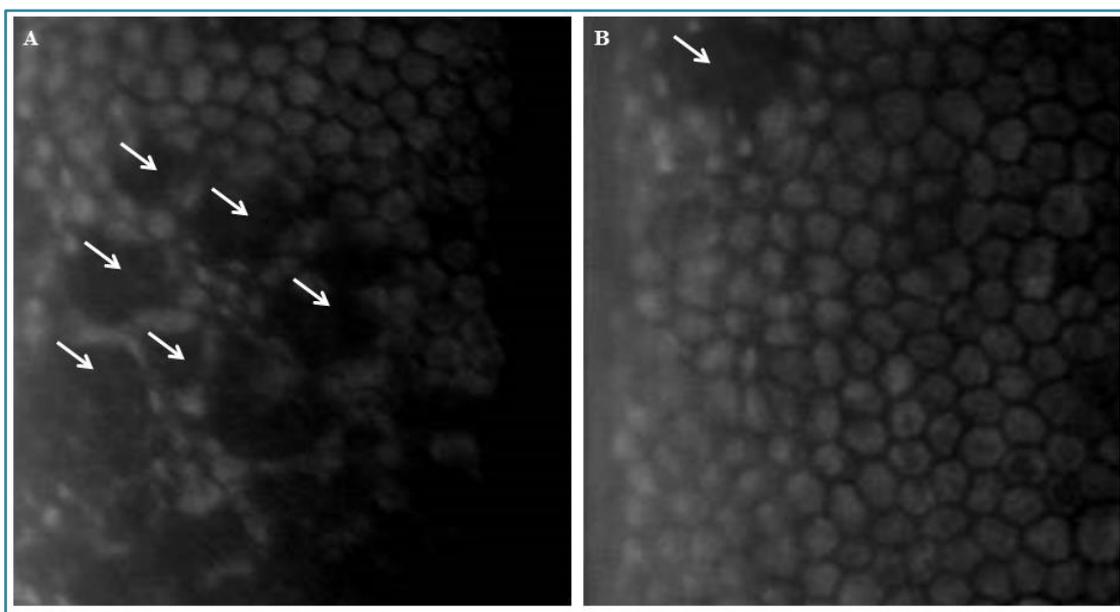
**Figura 30.** Imágenes de microscopía especular con (derecha) y sin magnificación (izquierda), incluyendo valores de CCT (T), ECD (CD) y MCA (AVG) del ojo E504-2 (grupo Control – no inyección) a las 0 horas (Microscopio especular SP-2000P). Visualización del endotelio corneal normal de conejo como una monocapa de células poligonales con tamaño y forma uniformes. En la imagen ampliada, los puntos blancos indican las 30 CECs seleccionadas para obtener los valores de MCA y ECD.

En los grupos 0,025% ( $p=0,033$ ), 0,05% ( $p=0,007$ ), 0,1% ( $p=0,023$ ) y 0,2% ( $p=0,004$ ) BAC, la **ECD disminuyó progresiva y significativamente** en comparación con el grupo de BSS. También se observó **aumento significativo de la MCA** en los grupos 0,05% ( $p=0,011$ ) y 0,2% ( $p=0,005$ ) BAC. El **CCT aumentó progresivamente en todos los grupos**, sin embargo, este aumento fue significativo únicamente en los grupos 0,1% ( $p<0,001$ ) y 0,2% ( $p=0,016$ ) BAC (Fig. 31).

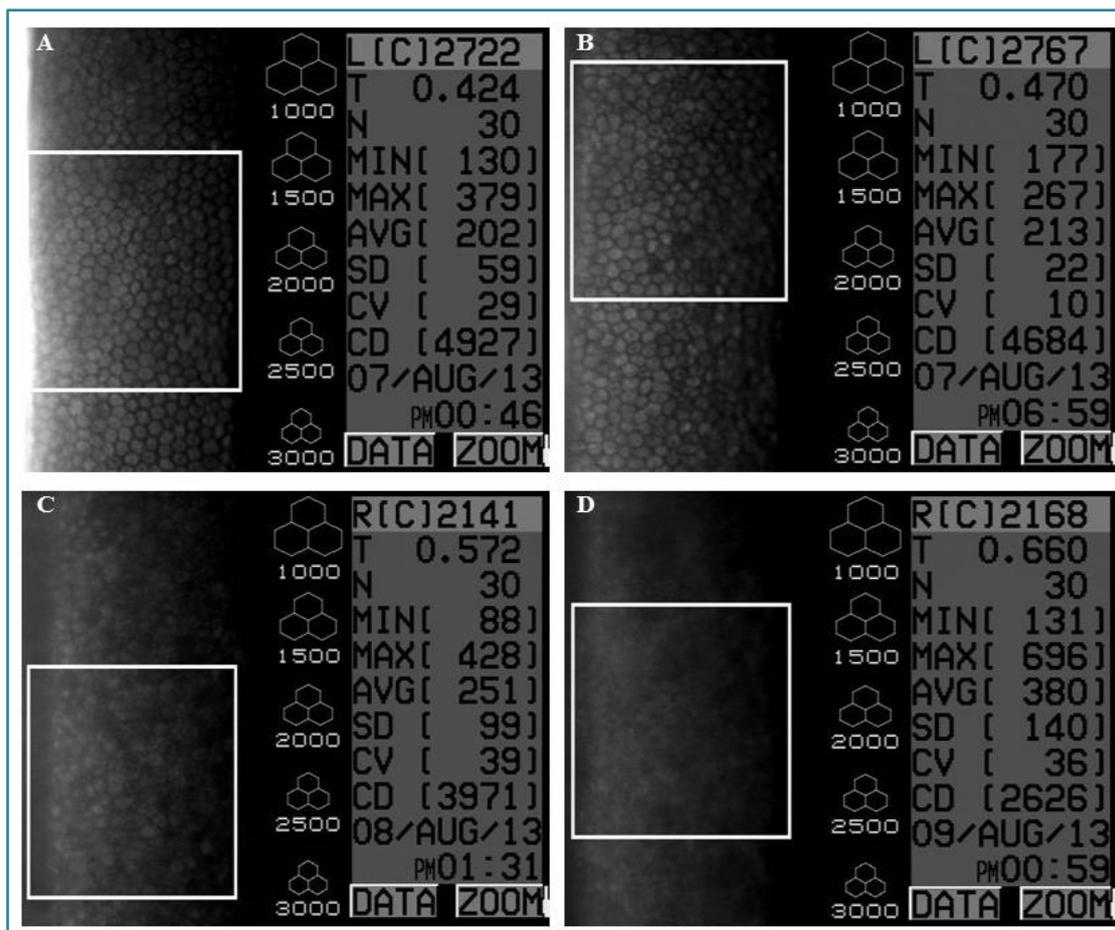
**Figura 31.** ECD (CECs/mm<sup>2</sup>), MCA (μm<sup>2</sup>) y CCT (μm) medias para cada uno de los diferentes grupos experimentales. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas para ese grupo (p<0,05), comparado con BSS.



En la mayoría de los ojos inyectados, independientemente del grupo experimental, la evaluación con microscopía especular permitió la visualización de **agujeros en el endotelio**, que aumentaron en número con el paso del tiempo. Los agujeros se atribuyeron a pérdida de CECs (Fig. 32). De forma similar, el paso del tiempo también afectó a la **CCT y la MCA**, detectándose **aumento progresivo y estadísticamente significativo** en todos los grupos. Por el contrario la **ECD disminuyó significativamente** con el paso del tiempo en todos los grupos (Fig. 33).



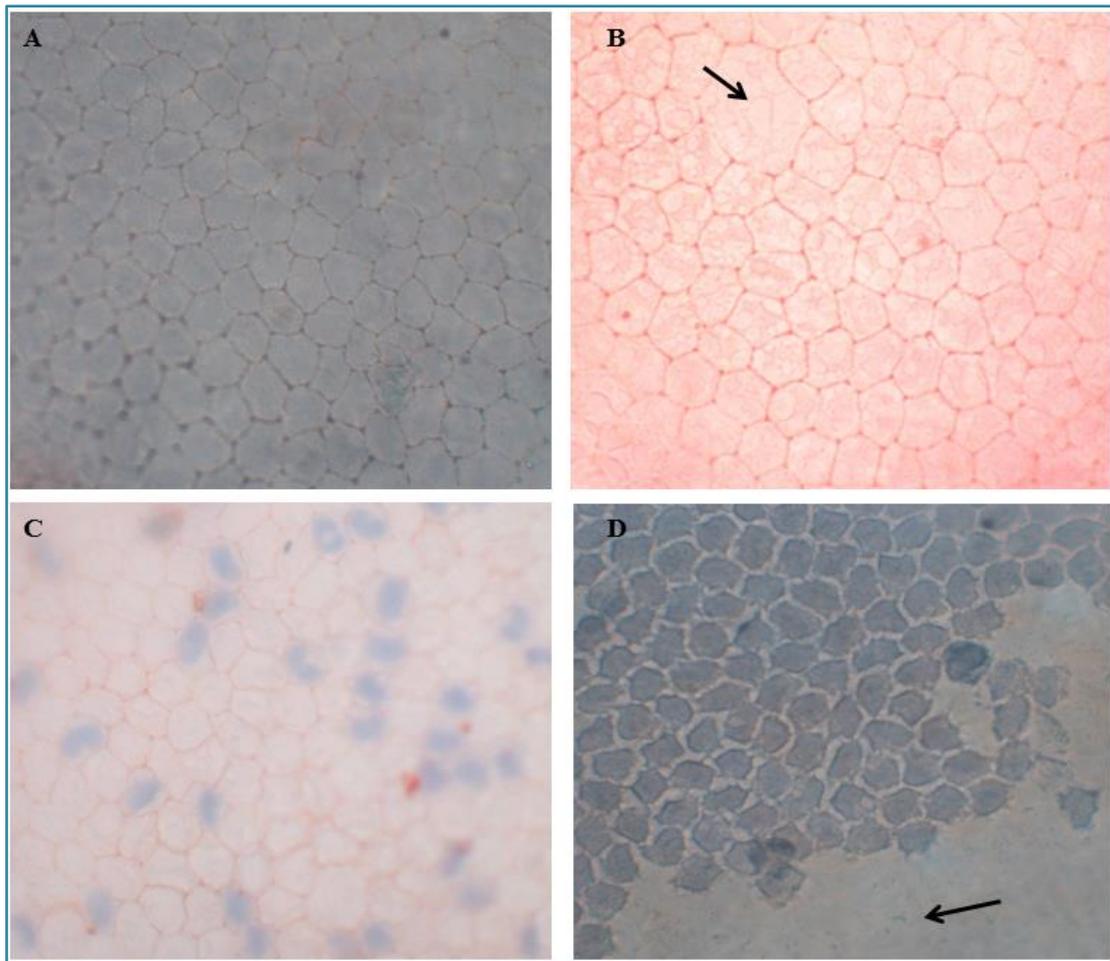
**Figura 32.** Imágenes de microscopía especular de los ojos E602-2 (A) y E604-2 (B), 6 horas tras la ICI de BAC al 0,025%, mostrando agujeros en el endotelio corneal (flechas) (Microscopio especular TOPCON SP-2000P).



**Figura 33.** Imágenes de microscopía especular incluyendo valores de CCT (T), ECD (CD) y MCA (AVG) del ojo E803-2 (grupo 0,005% BAC) a las 0 (A), 6 (B), 24 (C) y 48 (D) horas (Microscopio especular TOPCON SP-2000P). Con el paso del tiempo, se puede observar el incremento de CCT y MCA, y la disminución de la ECD.

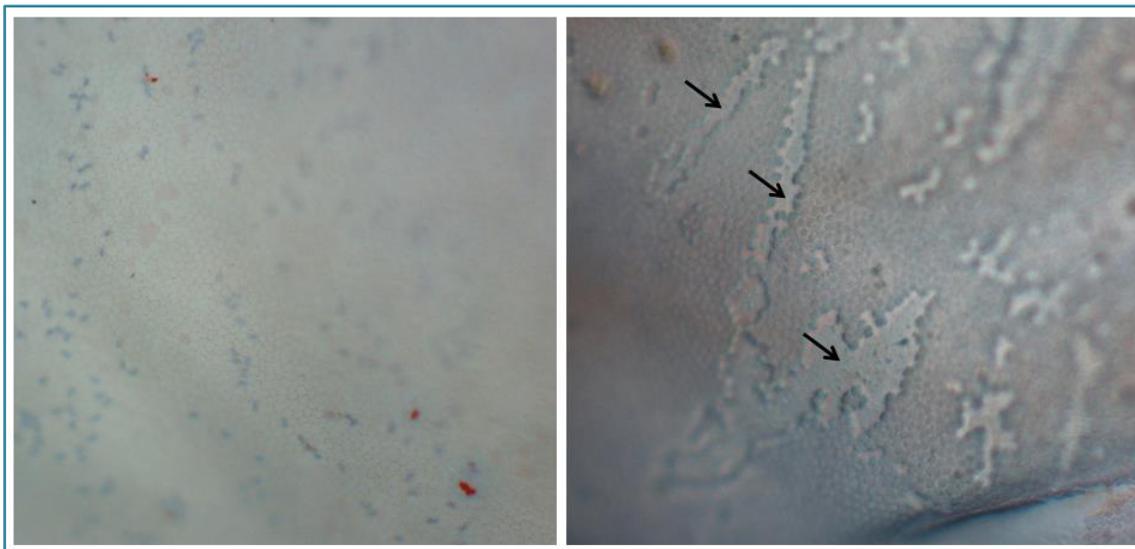
### 2.3. Tinciones vitales

Inicialmente se aplicó el protocolo descrito por Park et al.<sup>40</sup> al ser éste el más recientemente descrito, pero tras varios intentos, no pudieron obtenerse córneas con captación de colorantes suficientemente adecuada como para valorar el endotelio. En ese momento se optó por probar el protocolo más antiguo publicado por Taylor y Hunt.<sup>39</sup> Esta tinción funcionó desde el primer momento permitiéndonos observar los márgenes celulares gracias al rojo alizarina, y la mortalidad celular mediante el azul tripán (Fig. 34).



**Figura 34.** Imágenes microscópicas a 40x del CE de 4 ojos teñidos con azul tripán, y rojo alizarina. **A**, Ojo E501-2 (grupo Control – no inyección) no muestra captación de azul tripán; **B**, Ojo E101-2 (grupo BSS) no se tiñe con azul tripán. Se puede apreciar una célula gigante (flecha); **C**, Ojo E805-2 (BAC 0,05%) muestra algunas CECs teñidas con azul tripán con los bordes celulares menos definidos; **D**, Ojo E203 (BAC 0,1%) con todas sus CECs teñidas con azul tripán. También puede observarse un agujero en el CE (flecha).

La observación al microscopio óptico de las córneas teñidas permitió detectar también agujeros en el CE (Fig. 35).



**Figura 35.** Imágenes microscópicas a 10x de tinciones vitales, utilizando azul tripán y rojo alizarina. **A,** Ojo E603-2 (grupo 0,025% BAC): pueden apreciarse claramente las CECs, estando algunas de ellas teñidas con azul tripán; **B,** Ojo E203 (grupo 0,1% BAC): pueden observarse agujeros (flechas) en el endotelio corneal con ausencia de CECs.

### 2.3.1. Hexagonalidad

Los porcentajes de hexagonalidad celular para cada grupo 48 horas tras la ICI se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Valores de media, desviación estándar (SD), mínimo (Min), máximo (Max) y nivel de significación estadística (p-value) comparado con el Grupo BSS para los porcentajes de hexagonalidad de las CECs en cada grupo experimental a las 48 horas post-ICI.

	Media	SD	Min	Max	p-value vs Grupo Control	p-value vs Grupo BSS
Grupo Control	64,0	5,18	55,0	67,8	-	-
Grupo BSS	66,8	6,04	61,7	75,6	0,758	-
0,005% BAC	43,6	7,47	31,7	52,2	0,031	0,015
0,01% BAC	59,95	11,07	44,2	70,0	0,674	0,478
0,025% BAC	71,0	4,78	65,8	77,2	0,467	0,661
0,05% BAC	10,7	23,84	0	53,3	<0,001	<0,001
0,1% BAC	12,0	26,83	0	60,0	<0,001	<0,001
0,2% BAC	0	0	0	0	<0,001	<0,001

Al comparar con el grupo BSS, se observaron **aumentos significativos en el pleomorfismo de las CECs** (disminución significativa de la hexagonalidad) con concentraciones de BAC al 0,05% y superiores.

### 2.3.2. Mortalidad

El número de ojos por grupo, clasificados según el nivel de mortalidad celular, 48 horas tras la ICI, se muestran en la Tabla 5. Comparado con el grupo BSS, se observaron **aumentos significativos en la mortalidad de las CECs con concentraciones de BAC al 0,05% y superiores.**

**Tabla 5.** Número de casos por grupo que mostraron un grado de mortalidad BAJA, MEDIA o ALTA de CECs a las 48 horas post-ICI, y nivel de significación estadística (p-value) comparado con el grupo BSS.

	<b>BAJA</b>	<b>MEDIA</b>	<b>ALTA</b>	<b>p-value vs Grupo Control</b>	<b>p-value vs grupo BSS</b>
Grupo Control	5	0	0	-	-
Grupo BSS	5	0	0	1,000	-
0,005% BAC	4	1	0	0,423	0,423
0,01% BAC	3	1	0	0,346	0,346
0,025% BAC	4	1	0	0,423	0,423
0,05% BAC	1	0	4	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
0,1% BAC	0	0	3	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
0,2% BAC	0	0	5	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

### **3. Interpretación de resultados del estudio ex vivo**

Los resultados de este estudio *ex vivo* indican que:

- La ICI de BAC en los ojos de conejos *ex vivo* provoca un **efecto tóxico dosis-dependiente sobre el CE.**
- Al aumentar la dosis de BAC, se producen **incrementos en CCT y MCA y disminución de la ECD.**
- La ICI de 0,1 ml de **BAC 0,05%** (y no las concentraciones inferiores) **causa un aumento significativo en la mortalidad y el pleomorfismo de las CECs.**

**Estos datos sugieren que la dosis de partida más adecuada para estudios *in vivo* enfocados a desarrollar un modelo animal repetible y reproducible de enfermedad endotelial en conejos, debería ser de 0,1 ml de BAC al 0,05%.**

En base a lo observado en este estudio *ex vivo*, y a pesar de que las extrapolaciones a animales vivos deben realizarse cautelosamente, concentraciones de BAC más altas de 0,05% podrían provocar edema corneal rápido e intenso *in vivo*, posiblemente acompañado de inflamación intraocular grave.

---

# **ESTUDIO *in vivo***

---



## **1. Material y Métodos**

Todos los procedimientos realizados en este estudio se hicieron acorde con las directrices de la ARVO (*Association for the Research in Vision and Ophthalmology*). El protocolo experimental fue aprobado por el comité ético de la UAB (*Comissió Ètica d' Experimentació Animal i Humana*, CEEAH, UAB), con el número de referencia "CEAAH 1969", y por el *Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural* (DARP) de la Generalitat de Catalunya, con el número de referencia "DARP 7240".

### **1.1. Instalaciones**

La parte experimental del estudio *in vivo* se llevó a cabo en los quirófanos experimentales y en las instalaciones del *Servei d'Oftalmologia* de la *Facultat de Veterinària* de la UAB.

### **1.2. Conejos**

En este estudio se incluyeron, 24 conejos adultos sanos, de raza Neozelandés, y entre 2,0 y 2,5 kg, procedentes de un centro autorizado para la venta de animales de experimentación (*Animals Experimentals Riera* (Barcelona). Durante el estudio, cada conejo se alojó en un habitáculo individual de 0,9 m<sup>2</sup>, con las condiciones ambientales controladas (temperatura ambiente de 20°C y 60% de humedad relativa). Se les suministró dieta estándar de mantenimiento para conejos (*Oxbow Adult rabbit food*, Oxbow Animal Health, Murdock, NE, USA) una vez al día, y agua y heno *ad libitum*.

Los conejos se trasladaron a las instalaciones tres días antes de iniciar el estudio. Durante este periodo de aclimatación, fueron examinados diariamente, con el fin de garantizar su buen estado de salud antes de entrar en el estudio, y

permitir que se acostumbrasen a las instalaciones y al manejo por parte de los investigadores implicados en el mismo.

### **1.3. Productos**

Para la realización del estudio *in vivo* se utilizaron los mismos productos que para el estudio *ex vivo* (BAC y BSS). Las formulaciones de BAC a las diferentes concentraciones necesarias para las inyecciones intracamerales, se realizaron también de forma estéril en la *Farmàcia Xalabarder*, Barcelona.

### **1.4. Diseño experimental**

#### **1.4.1. Evaluación prequirúrgica**

Para cada conejo, como en el estudio *ex vivo*, la evaluación prequirúrgica incluyó: exploración oftalmológica, paquimetría y microscopía especular.

##### **➤ Exploración oftalmológica**

La exploración oftalmológica completa incluyó biomicroscopía con lámpara de hendidura (*SL-15 Portable Slit-Lamp Biomicroscope*<sup>®</sup>, Kowa Co. Ltd., Tokyo, Japón), tonometría (Tonovet<sup>®</sup>-P, Icare Finland Oy, Helsinki, Finlandia) y oftalmoscopia indirecta (Oftalmoscopio indirecto Omega<sup>®</sup>, Heine, Alemania). Aquellos conejos con evidencias de enfermedad corneal y/o del segmento anterior fueron excluidos del estudio. El grado de edema corneal se cuantificó de 0 (ausencia de edema corneal) a +4 (edema corneal severo), y el grado de congestión conjuntival también fue puntuado de 0 a 3 en función de la severidad.

##### **➤ Paquimetría y microscopía especular**

Las mediciones paquimétricas y especulares se llevaron a cabo sin sedación, con los animales sujetos gentilmente por un ayudante con

experiencia. Cada conejo se colocó de forma que la córnea quedase correctamente posicionada frente al microscopio especular (Fig. 36), y de la misma manera que en el estudio *ex vivo*, se capturaron 3 imágenes de la parte central de la córnea del ojo inyectado de cada conejo. Estas imágenes sirvieron para calcular la **MCA**, la **ECD**, la **CCT** y el **coeficiente de variación (CV)**; expresado en % y utilizado como medida de **polimegatismo**).



**Figura 36.** Posicionamiento y sujeción de un conejo en el momento de realizar la captación de imágenes y mediciones con el microscopio especular.

#### **1.4.2. Inyecciones intracamerales**

Mediante un programa de randomización (*Random.org*), los 24 conejos seleccionados tras la evaluación prequirúrgica, fueron asignados aleatoriamente a uno de los **4 grupos de estudio**, de 6 conejos cada uno:

- **Grupo BSS o grupo control:** ICI de 0,1 ml de BSS.
- **Grupo 0,025% BAC:** ICI de 0,1 ml de BAC al 0,025%.
- **Grupo 0,05% BAC:** ICI de 0,1 ml de BAC al 0,05%.
- **Grupo 0,1% BAC:** ICI de 0,1 ml de BAC al 0,1%.

Para realizar la ICI, los conejos fueron anestesiados utilizando el siguiente **protocolo anestésico**:

- **Inducción de la anestesia** mediante combinación intramuscular de 0,5 mg/kg de butorfanol (*Turbogesic*®, Fort Dodge Veterinaria, Girona) y 2 mg/kg de midazolam (Midazolam Hospira, Hospira Productos Farmacéuticos y Hospitalarios SL, Alcobendas).
- **Mantenimiento de la anestesia inhalatoria** con oxígeno e isoflurano 2-3% (*Isoflurane*®, Abbott Laboratories, Abbot Park, IL, EE.UU.) administrados a través de una mascarilla.

La asignación del ojo a inyectar también se realizó de forma aleatoria utilizando el mismo programa, de modo que 12 conejos recibieron una ICI en el ojo izquierdo (OS) y 12 en el ojo derecho (OD). Además, dentro de cada grupo experimental de 6 conejos, 3 de ellos recibieron la inyección en OS y 3 en OD.

Antes de la ICI, el área fue desinfectada usando una solución de povidona yodada diluida al 5%, y se aplicó una gota de anestésico tópico (Colircusí anestésico doble®, Laboratorios Alcon, El Masnou, Barcelona). Bajo anestesia general, se realizó la **ICI** utilizando una aguja de 27G, con la ayuda de gafas lupa y un blefarostato. Tras dejar salir una o dos gotas de humor acuoso, se inyectaron los 0,1 ml del compuesto apropiado en cada caso en cámara anterior. A continuación, se aplicó presión con pinzas conjuntivales durante 20 segundos con el fin de evitar la pérdida excesiva de humor acuoso. Una vez realizada la inyección, se aplicó una gota de tobramicina (*Tobrex*®, laboratorios Alcon Cusí, El Masnou, Barcelona).

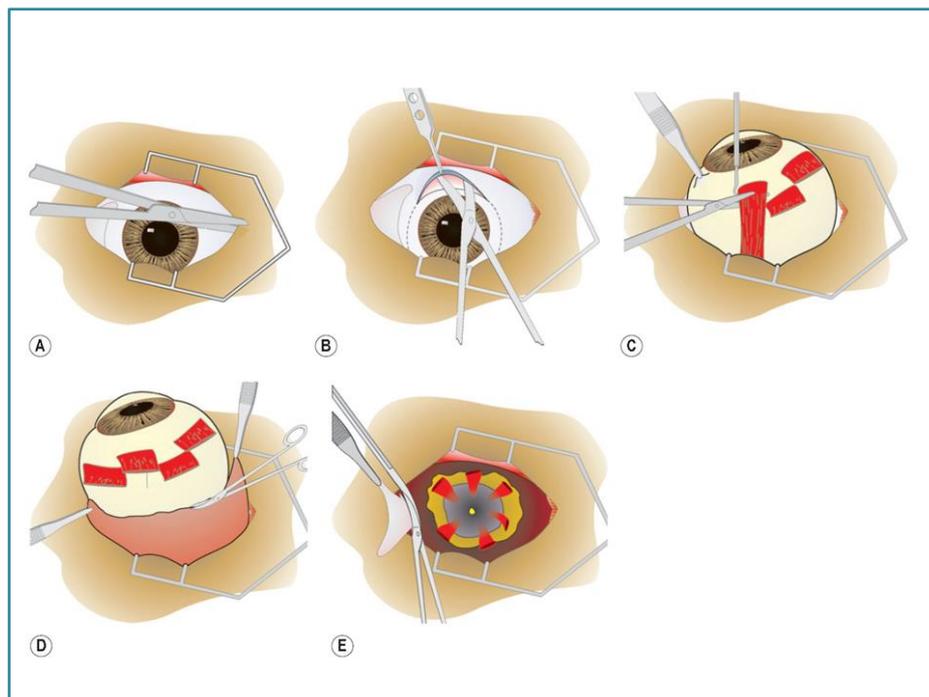
Tras la anestesia, cada conejo recibió, por vía subcutánea, 0,5 mg/kg de metoclopramida (*Primperan*<sup>®</sup>, Sanofi Aventis, Barcelona) y 2 mg/kg de ranitidina (Ranitidina Normon<sup>®</sup>, Laboratorios Normon SA, Madrid) cada ocho horas, tres veces, con el objetivo de mejorar la motilidad intestinal. Además, se les administró una dieta de recuperación (*Oxbow Critical Care*<sup>®</sup>, Oxbow Animal Health, Murdock, NE, EEUU.).

### **1.4.3. Seguimiento**

Diariamente, se realizó exploración oftalmológica básica, así como examen físico general para controlar los niveles de dolor post-ICI. Siguiendo el mismo protocolo de evaluación prequirúrgica, a los 2, 7 y 14 días post-ICI se realizó la evaluación mediante biomicroscopía, paquimetría y microscopía especular.

### **1.4.4. Eutanasia y enucleación**

Después del control de seguimiento final a los 14 días post-ICI, los conejos se anestesiaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente y fueron eutanasiados mediante sobredosis de pentobarbital intravenoso (*Dolethal*<sup>®</sup>, Vetoquinol, Alcobendas, Madrid). Inmediatamente tras la eutanasia, se procedió a la enucleación subconjuntival del ojo inyectado (Fig. 37), para su posterior evaluación con tinciones vitales e histopatología.



**Figura 37.** Procedimiento de enucleación utilizado en el estudio in vivo (modificado a partir de Gelatt Kirk N. Chapter 4: Surgery of the orbit. En: Gelatt, Kirk N., and Janice P. Gelatt. *Veterinary ophthalmic surgery*. Elsevier Health Sciences, 2011).

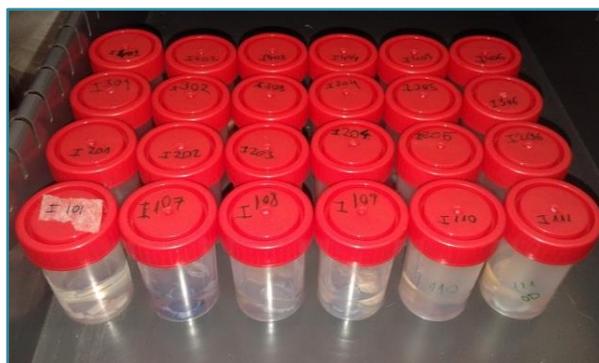
#### 1.4.5. Tinciones vitales

El procedimiento de tinción y las evaluaciones de mortalidad y pleomorfismo de las CECs se realizó siguiendo el mismo protocolo utilizado en el estudio ex vivo.

#### 1.4.6. Histopatología

Después de la observación microscópica de las muestras teñidas, las córneas se fijaron con formol al 4% junto con el resto del globo ocular (Fig. 38).

**Figura 38.** Aspecto de los 24 ojos del estudio in vivo una vez enucleados y tras la observación microscópica de las córneas teñidas.



Los ojos se enviaron a un laboratorio de histología (IDEXX Laboratories, Barcelona), donde se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 4  $\mu\text{m}$  de espesor. Posteriormente, las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina y evaluadas bajo el microscopio por una patóloga especializada en histopatología ocular. Su evaluación se centró en valorar y clasificar los posibles efectos del BAC sobre el resto de estructuras oculares.

Las evaluaciones histológicas permitieron cuantificar el daño sobre el CE en función de la **pérdida de CECs**, de 1+ (ninguna o una mínima pérdida de CECs) a 4+ (marcada reducción del número de CECs).

#### **1.4.7. Análisis estadístico**

Basándonos en los resultados obtenidos en el estudio ex vivo, se estableció un número mínimo de 6 animales por grupo para obtener datos estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con IBM SPSS (versión 20, Armonk, Nueva York, NY, USA) y el nivel de significación alfa se fijó en 0,05.

Los resultados se presentaron por grupos según las concentraciones de BAC. Las variables **cualitativas y ordinales** se resumieron en forma de frecuencias absolutas y relativas. Para las variables **cuantitativas**, se utilizaron la mediana y el rango intercuartílico [percentiles 25 y 75], y para las **continuas** el rango (mínimo, máximo). El **grado de edema corneal** se analizó comparando cada concentración de BAC con el grupo BSS mediante la prueba de Mann-Whitney.

El análisis para la **evaluación longitudinal** se realizó mediante una transformación de rango de variables dependientes a fin de obtener un enfoque no paramétrico antes de la aplicación de un modelo de *Generalized Estimating*

*Equations* (GEE) con una estimación de la correlación intra-sujeto con un enfoque de AR(1). Estos modelos incluyen el grupo experimental, el tiempo y su interacción con factores como los resultados iniciales de las variables independientes como covariable.

## **2. Resultados**

### **2.1. Exploración oftalmológica**

A los dos días de la ICI, se observó **aumento significativo de la severidad del edema corneal** en los grupos 0,025%, 0,05% y 0,1% BAC. Sin embargo, este efecto significativo se mantuvo durante el resto del estudio solamente en los grupos 0,05% y 0,1% BAC (Tabla 6).

De forma similar, también se detectó **incremento de congestión conjuntival**, que fue significativo a partir de los 2 días post-ICI con BAC al 0,025%, 0,05% y 0,1%. No obstante, éste siguió siendo significativo hasta los 14 días solamente con BAC al 0,1% (Tabla 7).

**Tabla 6.** Porcentaje de casos clasificados en cada uno de los distintos grados de edema corneal [0: no edema; +1: edema corneal leve; +2: edema corneal moderado; +3 edema corneal severo; +4: edema corneal muy severo] a los 0, 2, 7 y 14 días post-ICI in vivo y nivel de significación estadística (p-value), comparado con el grupo BSS.

<b>Día</b>	<b>Grado de edema corneal</b>	<b>BSS (n=6)</b>	<b>0,025% BAC (n=6)</b>	<b>0,05% BAC (n=6)</b>	<b>0,1% BAC (n=6)</b>
0d	0	100%	100%	100%	100%
	+1	0%	0%	0%	0%
	+2	0%	0%	0%	0%
	+3	0%	0%	0%	0%
	+4	0%	0%	0%	0%
	<i>p-value vs BSS</i>			1,000	1,000
2d	0	100%	0%	0%	0%
	+1	0%	0%	0%	0%
	+2	0%	66,7%	16,7%	0%
	+3	0%	33,3%	83,3%	100%
	+4	0%	0%	0%	0%
	<i>p-value vs BSS</i>			<b>0,002</b>	<b>0,002</b>
7d	0	100%	16,7%	0%	0%
	+1	0%	83,3%	16,7%	0%
	+2	0%	0%	83,3%	66,7%
	+3	0%	0%	0%	33,3%
	+4	0%	0%	0%	0%
	<i>p-value vs BSS</i>			0,015	<b>0,002</b>
14d	0	100%	83,3%	0%	0%
	+1	0%	16,7%	83,3%	16,7%
	+2	0%	0%	16,7%	66,7%
	+3	0%	0%	0%	16,7%
	+4	0%	0%	0%	0%
	<i>p-value vs BSS</i>			1,000	<b>0,002</b>

**Tabla 7.** Porcentaje de casos clasificados en cada uno de los distintos grados de congestión conjuntival (puntuada de 0 a 3) a los 0, 2, 7 y 14 días post-inyección in vivo, y nivel de significación estadística (p-value) comparado con el grupo BSS.

Día	Grado de congestión conjuntival	BSS (n=6)	0,025% BAC (n=6)	0,05% BAC (n=6)	0,1% BAC (n=6)
0d	0	100%	100%	100%	100%
	1	0%	0%	0%	0%
	2	0%	0%	0%	0%
	3	0%	0%	0%	0%
		<i>p-value vs BSS</i>	1,000	1,000	1,000
2d	0	66,7%	0%	0%	0%
	1	33,3%	66,7%	50%	0%
	2	0%	33,3%	50%	33,3%
	3	0%	0%	0%	66,7%
		<i>p-value vs BSS</i>	<b>0,032</b>	<b>0,022</b>	<b>0,002</b>
7d	0	100%	83,3%	50%	0%
	1	0%	16,7%	50%	0%
	2	0%	0%	0%	66,7%
	3	0%	0%	0%	33,3%
		<i>p-value vs BSS</i>	1,000	0,182	<b>0,002</b>
14d	0	100%	100%	66,7%	0%
	1	0%	0%	33,3%	33,3%
	2	0%	0%	0%	66,7%
	3	0%	0%	0%	0%
		<i>p-value vs BSS</i>	1,000	0,455	<b>0,002</b>

A parte de los signos clínicos previamente citados, se observó, de forma esporádica, casos de ulceración corneal (8/24), cataratas (6/24) y formación de fibrina en cámara anterior (10/24). Las úlceras corneales fueron en todos los casos epiteliales, observándose un aumento significativo con BAC al 0,1% ( $p=0,015$ ) (Tabla 8). Por lo que respecta a desarrollo de cataratas y fibrina en cámara anterior durante el estudio, no se vieron diferencias significativas entre grupos. Tanto las úlceras corneales como la fibrina en cámara anterior resolvieron sin medicación alguna en 2-3 días, no mostrando en ningún

momento signos de dolor. Las cataratas observadas fueron, en todos los casos, cataratas inmaduras corticales anteriores.

**Tabla 8.** Número y porcentaje de casos en cada grupo experimental que desarrollaron (Sí) o no (NO) úlcera corneal, catarata o fibrina en cámara anterior durante el estudio in vivo, y nivel de significación estadística (p-value) comparado con el grupo BSS. (NE: no estimable).

		<b>BSS</b> (n=6)	<b>0,025% BAC</b> (n=6)	<b>0,05% BAC</b> (n=6)	<b>0,1% BAC</b> (n=6)
<i>Úlcera corneal</i>	No	6; 100%	6; 100%	3; 50%	1; 16,7%
	Sí	0; 0%	0; 0%	3; 50%	5; 83,3%
	<i>p-value vs BSS</i>		NE	0,182	<b>0,015</b>
<i>Catarata</i>	No	6; 100%	5; 83,3%	4; 66,7%	3; 50%
	Sí	0; 0%	1; 16,7%	2; 33,3%	3; 50%
	<i>p-value vs BSS</i>		1,000	0,455	0,182
<i>Fibrina</i>	No	4; 66,7%	4; 66,7%	4; 66,7%	2; 33,3%
	Sí	2; 33,3%	2; 33,3%	2; 33,3%	4; 66,7%
	<i>p-value vs BSS</i>		1,000	1,000	0,567

No se observaron cambios notables en la IOP en los grupos, a pesar de que el primer día post-ICI algunos conejos mostraron de forma transitoria queratocono, con aspecto pseudo-buftálmico (Fig. 39). Esta lesión, que ocurrió incluso con las concentraciones más bajas de BAC, resolvió gradualmente de forma espontánea entre dos y tres días después de la ICI en todos los casos.



**Figura 39.** Conejo I205 3 días tras la inyección ICI de BAC al 0,025%. Como consecuencia de la inyección del tóxico, el ojo izquierdo (ojo inyectado) mostró de forma transitoria queratocono, con aspecto pseudo-buftálmico.

## 2.2. Paquimetría

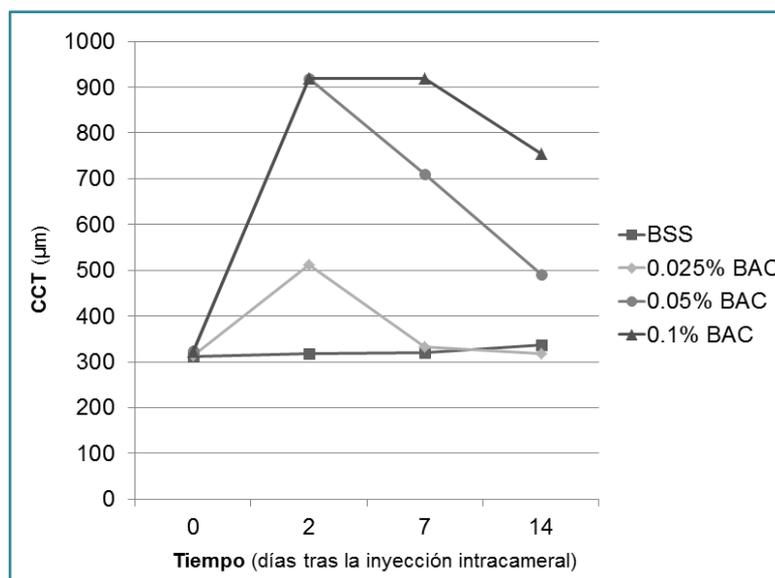
El microscopio especular Topcon SP-2000P obtuvo imágenes claras del CE en córneas sanas o ligeramente edematosas (Fig. 40), pero la obtención de imágenes no fue posible en córneas con edema moderado o severo.



**Figura 40.** Imágenes de microscopía especular con magnificación (derecha) y sin magnificación (izquierda) incluyendo valores de CCT (T), ECD (CD) y MCA (AVG) del ojo izquierdo del conejo I110, 14 días tras la ICI de BSS (Microscopio especular SP-2000P). Visualización del endotelio corneal normal de conejo como una monocapa de células poligonales con tamaño y forma uniformes. En la imagen ampliada, los puntos blancos indican las 30 CECs seleccionadas para obtener los valores de MCA y ECD.

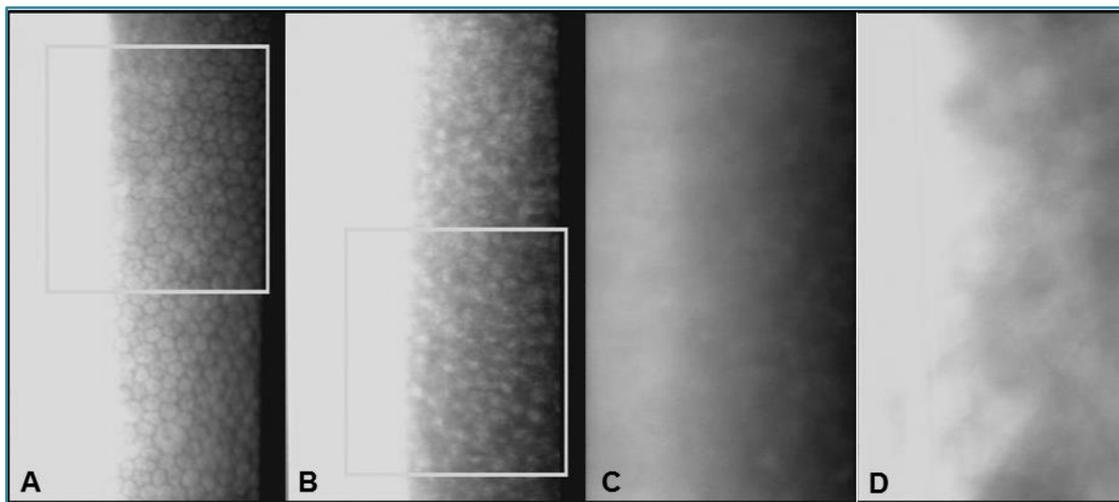
Las mediciones de paquimetría evidenciaron efecto tóxico dosis-dependiente del BAC. A los 2 días post-ICI, se observó **aumento significativo de CCT** en todos los grupos de BAC. Sin embargo, este efecto solo se mantuvo con valores estadísticamente significativos ( $p < 0,01$ ) en los grupos 0,05% y 0,1% BAC (Fig. 41).

**Figura 41.** CCT ( $\mu\text{m}$ ) media para cada uno de los diferentes grupos experimentales a los 0, 2, 7 y 14 días post-ICI.



### 2.3. Microscopía especular

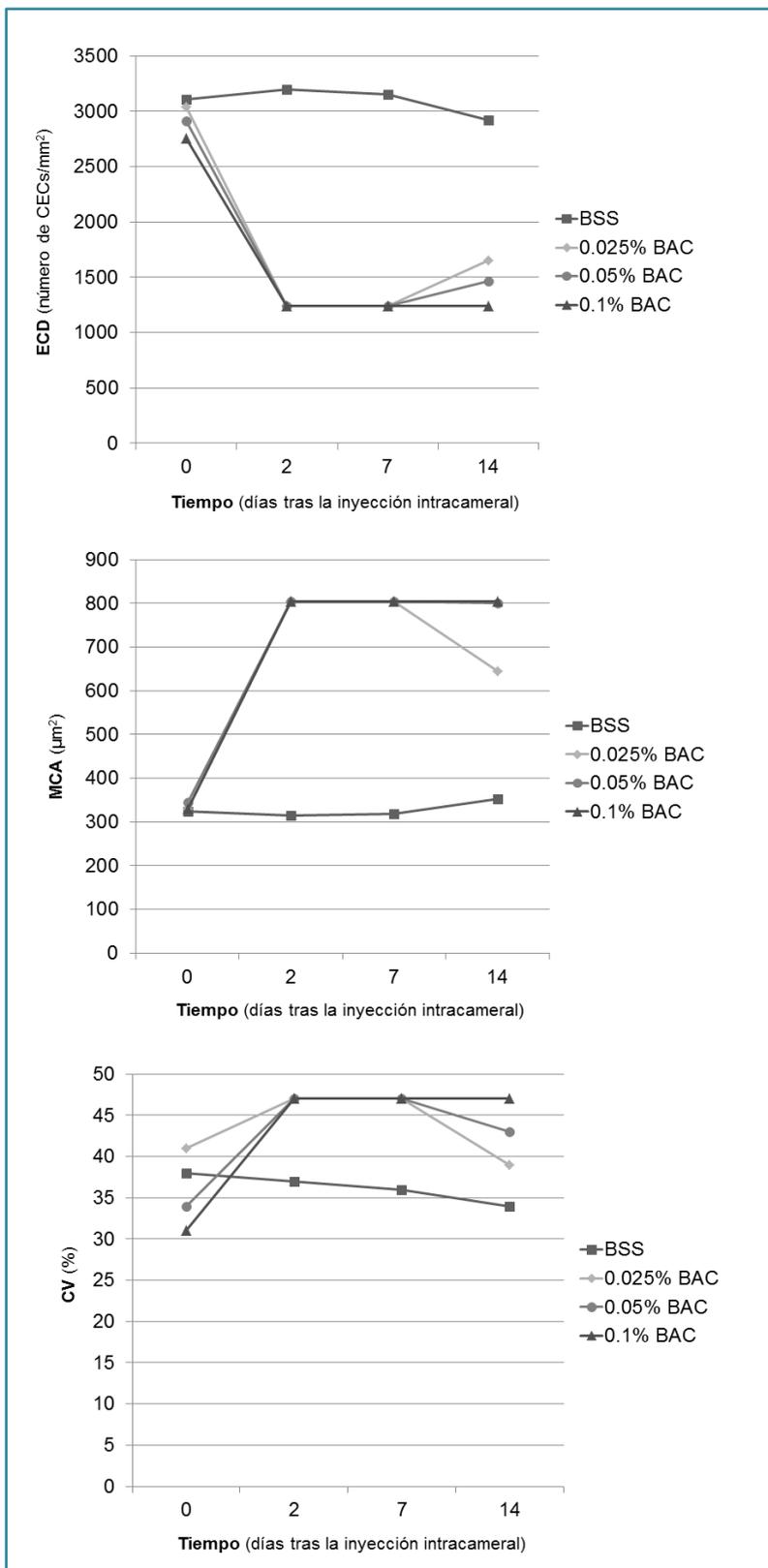
La microscopía especular también confirmó el efecto tóxico dosis-dependiente de la ICI de BAC *in vivo* (Fig. 42).



**Figura 42.** Imágenes de microscopía especular (Microscopio especular TOPCON SP-2000P) de diferentes ojos correspondientes a los grupos BSS (A), 0,025% BAC (B), 0,05% BAC (C) y 0,1% BAC (D) a los 7 días post-ICI, donde se puede apreciar el efecto tóxico dosis-dependiente sobre la estructura del endotelio corneal.

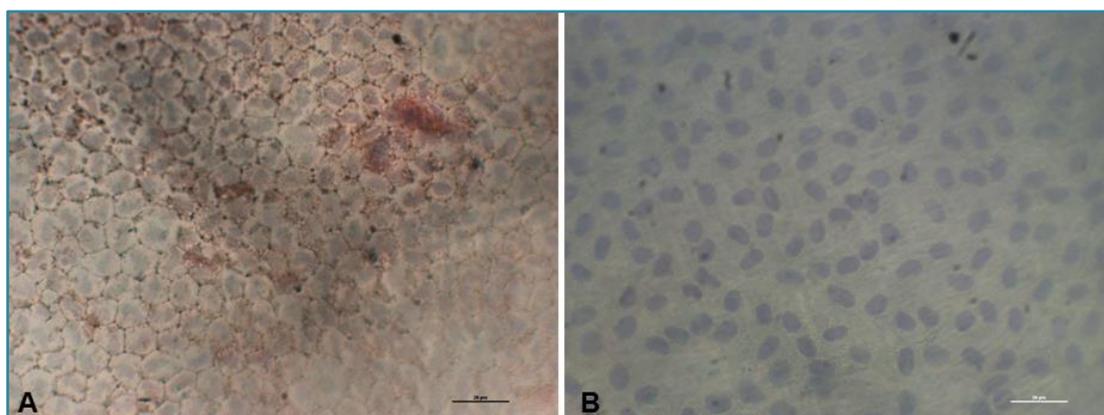
En comparación con BSS, se vio **marcada disminución** ( $p < 0,01$ ) **en ECD y aumento significativo en MCA** en todos los grupos de BAC a partir de 2 días post-ICI. De forma similar, **el CV se vio significativamente incrementado** en todos los grupos de BAC 2 días post-ICI, pero sólo continuó siendo significativo ( $p < 0,01$ ) en los grupos 0,05% y 0,1% BAC (Fig. 43).

**Figura 43.** ECD (CECs/mm<sup>2</sup>), MCA (μm<sup>2</sup>) y CV (%) medios para cada uno de los diferentes grupos experimentales a los 0, 2, 7 y 14 días post-ICI.



## 2.4. Tinciones vitales

Las tinciones endoteliales con rojo alizarina y azul tripán evidenciaron **efecto tóxico dosis-dependiente tanto sobre la hexagonalidad como sobre la mortalidad** de las CECs (Fig. 44). A los 14 días post-ICI todos los grupos de BAC mostraron disminución significativa del porcentaje de hexagonalidad de las CECs (**aumento de pleomorfismo**); mientras que la **mortalidad** de las CECs solo fue **significativamente mayor con BAC al 0,05% y 0,1%** ( $p=0,002$ ) (Tabla 9).



**Figura 44.** Imágenes microscópicas a 40x de tinciones vitales utilizando azul tripán y rojo alizarina, de los ojos inyectados de los conejos I101 (A; grupo BSS) y I405 (B; grupo 0,1% BAC), donde se puede apreciar como la ICI de la dosis más elevada de BAC en este estudio provocó marcado aumento de pleomorfismo y mortalidad de las CECs.

**Tabla 9.** Porcentajes medios de hexagonalidad y de mortalidad de CECs 14 días post-ICI.

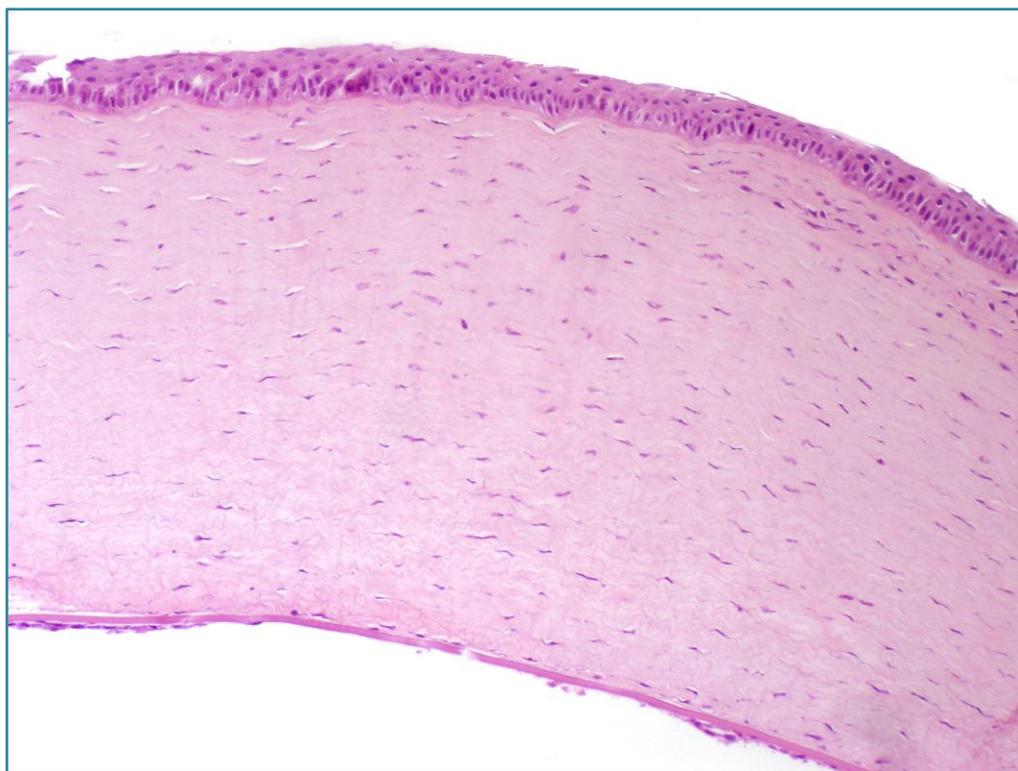
		<b>BSS</b> (n=6)	<b>0,025% BAC</b> (n=6)	<b>0,05% BAC</b> (n=6)	<b>0,1% BAC</b> (n=6)
<b>Hexagonalidad</b>		82,5%	50%	14,2%	2,8%
		<i>p-value vs BSS</i>	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Mortalidad</b>	BAJA	6;100%	3;50%	0;0%	0;0%
	MEDIA	0;0%	3;50%	1;16,7%	0;0%
	ALTA	0;0%	0;0%	5;83,3%	6;100%
		<i>p-value vs BSS</i>	0,180	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>

## **2.5. Histopatología**

Los hallazgos histopatológicos de los ojos tratados con BAC evidenciaron, en la mayoría de los casos, lesiones localizadas exclusivamente en endotelio corneal y conjuntiva, estando el resto de estructuras oculares exentas de lesiones.

A pesar de que el endotelio corneal mostró **pérdida de CECs de diferente magnitud** en todos los grupos BAC, los cambios no fueron estadísticamente significativos al compararlos con el grupo control (Fig. 45). Esta pérdida de CECs fue, en general, por segmentos, observándose zonas en las que prácticamente habían desaparecido las CECs por completo, y otras en las que aparecían moderadamente preservadas. En algunos casos, se observó rotura de la membrana de Descemet.

Paralelamente a los hallazgos corneales los grupos de BAC al 0,05% y 0,1% mostraron incremento significativo de casos con infiltrado de tipo linfoplasmocitario en la conjuntiva bulbar, cerca del limbo esclerocorneal, que fue clasificado histológicamente como conjuntivitis (Tabla 10). Por otro lado, el cristalino era normal en la práctica totalidad de los ojos evaluados, exceptuando los hallazgos esporádicos de glóbulos morganiianos en dos casos del grupo 0,05% BAC y en uno del grupo 0,1% BAC.



**Figura 45.** Imagen histológica a 10x del ojo izquierdo (ojo inyectado) del conejo I310, perteneciente al grupo 0,05% BAC, 14 días post-ICI. Puede observarse marcada pérdida de CECs.

**Tabla 10.** Número de casos y porcentajes en cada grupo experimental clasificados en función del grado de pérdida de CECs [de 1+ (ninguna o mínima pérdida de CECs) a 4+ (marcada reducción en el número de CECs)] y del grado de conjuntivitis [de 0 (ausencia) a 3+ (conjuntivitis severa)].

		<b>BSS</b> (n=6)	<b>0,025% BAC</b> (n=6)	<b>0,05% BAC</b> (n=6)	<b>0,1% BAC</b> (n=6)
Pérdida de CECs	1+	1 (16,7%)	2 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)
	2+	2 (33,3%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)
	3+	2 (33,3%)	2 (33,3%)	3 (50%)	3 (50%)
	4+	1 (16,7%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)
	<i>p-value vs BSS</i>		0,994	0,374	0,374
Conjuntivitis	0	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	1+	2 (33,3%)	3 (50%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)
	2+	1 (16,7%)	1 (16,7%)	3 (50%)	3 (50%)
	3+	0 (0%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)
	<i>p-value vs BSS</i>		0,065	0,028	0,028

---

# DISCUSIÓN

---



Los resultados de los dos estudios incluidos en la presente tesis doctoral demuestran que **la ICI de 0,1 ml de BAC al 0,05% en conejos provoca daño selectivo sobre el CE preservando el resto de estructuras intraoculares. Estos hallazgos sugieren considerar éste como un modelo animal de enfermedad endotelial corneal repetible y reproducible.**

### ***Discusión sobre los resultados biomicroscópicos***

La **exploración oftalmológica mediante biomicroscopía**, demostró ser una **herramienta diagnóstica valiosa** para la detección de cambios oculares atribuibles a la toxicidad del BAC. La acción tóxica del BAC causó, tal y como se había hipotetizado, **incremento del edema corneal dosis-dependiente**, como resultado de la descompensación corneal de origen endotelial.<sup>7,15,78</sup> Esta descompensación fue significativa en todos los grupos del estudio *ex vivo*, y en los grupos de concentraciones igual o superiores a **BAC al 0,05%** del estudio *in vivo*. En este último estudio, **dosis superiores indujeron además complicaciones tales como marcada congestión conjuntival o ulceraciones corneales**, mientras que concentraciones menores de 0,05% no obtuvieron efecto tóxico suficiente para inducir y mantener el edema corneal durante la duración del estudio. Se puede concluir pues, que **la ICI de 0,1ml de BAC al 0,05% ejerce un efecto tóxico suficiente sobre el endotelio corneal**, mientras que la ICI de 0,1 ml de BAC al 0,1% representa, probablemente, una dosis excesivamente tóxica para la córnea.

Estos resultados son similares a los de Britton et al., quienes, en 1976, vieron que las administraciones intraoculares de BAC al 0,03% y al 0,05% provocaban

edema corneal, pero que solo la de BAC al 0,05% inducía marcada congestión conjuntival.<sup>87</sup>

En algunos conejos de todos los grupos BAC, el grado de edema corneal tan severo en los primeros días, indujo **queratocono secundario** y **pseudo-bulfalmia temporal**, que se resolvieron espontáneamente 2-3 días más tarde. La observación de esta anomalía podría deberse a dos supuestos: la destrucción parcial del endotelio corneal y su posterior renovación – restableciendo de esta forma la funcionalidad corneal–, o bien a la lesión parcial de algunas de las células endoteliales, no induciendo muerte celular, sino falta de funcionalidad temporal. A pesar de que las dos teorías son posibles, el tiempo necesario para la replicación del endotelio corneal en el conejo es superior a 2-3 días, lo que hace pensar en la segunda hipótesis como la más probable.

La biomicroscopía del presente estudio también puso de manifiesto **fibrina en cámara anterior** y **cataratas**. La respuesta fibrinoide del humor acuoso se observó, con incidencia similar, en todos los grupos del estudio (incluyendo el grupo BSS); lo cual defiende que esta respuesta inflamatoria aguda<sup>88</sup> pueda ser secundaria al procedimiento de punción *per se* y no al tóxico inyectado. Este signo inflamatorio, en caso de ser mínimo, se resuelve sin secuela alguna, pero en casos moderados o severos puede inducir sinequias o hipertensiones secundarias que requieran intervención quirúrgica.<sup>89</sup> Al igual que en el estudio de Swan et al.,<sup>81</sup> el grado de fibrina observado en nuestro estudio *in vivo* fue leve en todos los casos, no alterando el movimiento pupilar ni la IOP.

Las **cataratas** se detectaron únicamente en los grupos de BAC, observándose una tendencia dosis-dependiente, que no alcanzó diferencias significativas entre grupos. Los posibles efectos del BAC sobre el cristalino fueron inicialmente sugeridos por Baudouin et al. en el 2010, quienes observaron una incidencia significativamente elevada de cataratas en pacientes en tratamiento crónico con medicaciones tópicas que contienen BAC como excipiente.<sup>75</sup> Podríamos hipotetizar que el tiempo necesario para que el BAC induzca cataratas depende de la vía de administración utilizada, siendo mucho menor para ICI que para la tópica. A su vez, la concentración del BAC pudiera ser otro factor a tener en cuenta, ya que las medicaciones suelen contener BAC en concentraciones de entre 0,004 y 0,02%,<sup>79</sup> mientras que las concentraciones inyectadas en el presente estudio fueron iguales o superiores al 0,025%. El tipo de catarata observada en el presente estudio cuadra con una catarata tóxica por contacto, al estar localizadas en el córtex anterior en todos los casos. Su localización focalizada hizo que no se pudieran corroborar en el estudio histopatológico, probablemente debido al ángulo de corte de las secciones.

### ***Discusión sobre los hallazgos especulares y paquimétricos***

Al igual que en previos estudios sobre lesión endotelial,<sup>25,69,87</sup> la **microscopía especular** y **paquimetría** resultaron ser de gran valor para caracterizar, de forma detallada, los cambios producidos en el CE como consecuencia de la toxicidad del BAC.

En ambos estudios, el mismo microscopio especular TOPCON SP-2000P<sup>®</sup> permitió obtener imágenes claras del CE y realizar mediciones y recuentos de

varios parámetros de interés. Los valores iniciales de CCT y MCA de los conejos utilizados en este proyecto son similares a los descritos anteriormente.<sup>35</sup> No obstante, en ambos estudios fue imposible obtener imágenes de aquellos casos en los que el edema corneal era muy severo, dificultando la llegada de la luz emitida por el microscopio al CE. Esta problemática se ha descrito también en el hombre, en el que grados importantes de edema corneal dificultan el diagnóstico de lesiones endoteliales específicas.<sup>34</sup>

Los estudios especulares y paquimétricos confirmaron las hipótesis planteadas tanto *ex vivo* como *in vivo*. Se demostró la **relación directamente proporcional entre la concentración de BAC inyectada en cámara anterior, la CCT y la MCA**; así como la **relación inversamente proporcional entre la concentración de BAC y la ECD**.

En el estudio *ex vivo*, los aumentos de CCT y MCA fueron significativos a partir de BAC al 0,1% y al 0,05%, respectivamente, mientras que la disminución significativa de ECD se detectó a partir de BAC al 0,025%. En el estudio *in vivo*, estos mismos efectos fueron significativos para CCT, MCA y ECD a partir de BAC al 0,025%, aunque en el caso del CCT el grado de significación estadística fue mayor a los 7 y 14 días post-ICI con BAC 0,05%. Estas diferencias podrían ser debidas a los propios cambios que tienen lugar en un conejo vivo, en comparación con las variaciones que puedan verse en un ojo enucleado. El CV es un parámetro que se evaluó únicamente *in vivo* y cuyo incremento se mantuvo de forma significativa durante todo el estudio solamente con BAC al 0,05% y al 0,1%.

Otro hallazgo interesante, similar al descrito en personas expuestas a la acción tóxica del BAC intraocular,<sup>28</sup> fue los **agujeros endoteliales** en el estudio *ex vivo*, generados como consecuencia de la pérdida y descamación de CECs, dejando expuesta la membrana de Descemet, indistintamente del grupo de estudio. *In vivo*, pese a evidenciar claramente los cambios morfológicos en las CECs y el aumento de su mortalidad, no se apreciaron tan claramente estas áreas desprovistas de CECs. Este hallazgo, únicamente observado en el estudio *ex vivo*, podría ir asociado a la posible hipotonicidad post-ICI y afectación de las uniones de las células endoteliales post-mortem, facilitando ambos mecanismos el desprendimiento de las CECs de la membrana de Descemet.

Basándonos en las observaciones biomicroscópicas, especulares y paquimétricas de los estudios *ex vivo* e *in vivo*, la concentración de BAC al 0,05% cumpliría los requisitos necesarios para inducir el modelo animal objetivo del presente estudio.

### ***Discusión sobre las tinciones vitales***

La **tinción vital** del CE –combinando azul tripán y rojo alizarina– permitió, tal y como se ha descrito previamente,<sup>39,40</sup> visualizar fácilmente las CECs. En nuestros estudios, esta técnica aportó información muy útil, sobre todo en aquellos conejos en los que no fue posible obtener valores de microscopía especular debido al marcado edema corneal.

Hay dos protocolos similares descritos en la bibliografía, que a pesar de ser muy similares, presentan algunas diferencias, tales como el pH final, la concentración de las tinciones y el diluyente utilizado. El presente estudio se inició con el protocolo descrito por Park et al. en 2012,<sup>40</sup> pero lamentablemente, aun siguiendo los pasos descritos en la publicación, las córneas no se tiñeron bien y no se obtuvieron imágenes con captación de colorante suficientemente adecuada como para poder valorar el endotelio. Por ello se optó por utilizar el protocolo original descrito por Taylor y Hunt en 1981,<sup>39</sup> con el que obtuvimos muy buenos resultados, pudiendo valorar los márgenes celulares gracias al rojo alizarina y la mortalidad celular mediante el azul tripán. Se desconoce el motivo de estas discrepancias entre métodos, pero las diferentes concentraciones recomendadas por cada uno de los autores, la elección del diluyente (PBS o suero salino al 0,9%) y el pH, pueden tener un papel importante.

Las tinciones vitales de los ojos tratados pusieron de manifiesto los siguientes hallazgos dosis-dependientes: **aumento de agujeros o defectos del CE *ex vivo***, y **aumento de la mortalidad y del pleomorfismo de las CECs tanto *ex vivo* como *in vivo***. Los **agujeros endoteliales**, previamente asociados a la muerte y descamación de las células endoteliales,<sup>39,40,60,81</sup> debido a los efectos tóxicos del BAC, coincidieron con los hallazgos especulares, descartando de esta forma, posibles artefactos de procesamiento de las muestras durante las tinciones vitales. La ausencia de agujeros en el estudio *in vivo*, a pesar de tener mortalidades elevadas, podría asociarse al mantenimiento estable de la IOP y a las fuertes uniones entre las CECs y la membrana de Descemet.

El **aumento de la mortalidad celular** fue significativo a partir de concentraciones de BAC al 0,05% en ambos estudios, mientras que el

**aumento del pleomorfismo** fue significativo a partir de BAC al 0,025% en el estudio *in vivo* y a partir de BAC al 0,05% en el *ex vivo*. Aunque la diferencia es solamente de una dosis superior, hay algunos factores que podrían explicarla, tales como el diseño similar pero diferente de ambos estudios (número de animales), la variabilidad dentro de los grupos, y los valores diferentes de hexagonalidad de los grupos BSS (66,8% *ex vivo* y 82,5% *in vivo*), que sirvieron en ambos casos como grupo de comparación. Habría que mencionar, como diferencia entre los dos estudios, el hecho de que en el estudio *ex vivo* los ojos fueron enucleados y se conservaron en refrigeración durante las sucesivas evaluaciones, mientras que en el modelo *in vivo* se trataba de tejido vivo, con todas las implicaciones que esto conlleva al estar los ojos inyectados influidos por las reacciones de todo el organismo del. Es de suponer que en los ojos enucleados se produjo degradación celular por muerte celular, mientras que este proceso no tuvo lugar, en principio, *in vivo*. Estas diferencias podrían hacer menos realistas las comparaciones de resultados entre ambos estudios. Sin embargo, cabe remarcar que todos los ojos del estudio *ex vivo* estuvieron sujetos a las mismas condiciones, al igual que los ojos de los conejos del estudio *in vivo*.

A pesar de las diferencias, **ambos estudios realizados demuestran un efecto significativo del grupo 0,05% BAC sobre el pleomorfismo endotelial**. Este aumento de diversidad morfológica celular es consecuencia de la pobre capacidad de respuesta del endotelio a una agresión. A diferencia de la elevada capacidad de replicación del epitelio corneal, el endotelio de los conejos es mucho más vulnerable y a pesar de tener capacidad de replicación, no se regenera tan fácilmente. Sus células deben tratar de modificar su forma

para cubrir los defectos que se generan, hasta que la mitosis sea efectiva. Es por eso que se produce el incremento del pleomorfismo.<sup>12,13</sup> Tanto el pleomorfismo como el polimegatismo son indicadores de pérdida de CECs,<sup>6</sup> por lo que, tal y como se ha observado en el presente estudio, su aumento va asociado al aumento de la mortalidad de CECs.

El efecto dosis-dependiente del BAC sobre la viabilidad de las CECs coincide con las observaciones de Pauly et al. en un modelo tridimensional de CECs humanas. En ese estudio el aumento de la concentración de BAC indujo el descenso en la viabilidad celular como consecuencia de su efecto tóxico, que fue significativo 24 horas tras su aplicación a concentraciones de 0,005%.<sup>90</sup> Esta dosis demostró efectos tóxicos sobre el endotelio corneal, pero no lo suficientemente importantes como para inducir un modelo animal de enfermedad endotelial.

Añadiendo los datos de las tinciones vitales a los de las observaciones biomicroscópicas, especulares y paquimétricas, la concentración de BAC al 0,05% cumpliría los requisitos necesarios para inducir el modelo animal objetivo del presente estudio.

### ***Discusión de los hallazgos histopatológicos***

Dado que el objetivo del presente estudio es destruir selectivamente el CE, las **evaluaciones histológicas** se realizaron con el fin de complementar las observaciones biomicroscópicas y especulares, descartando posibles alteraciones del resto de estructuras oculares, que hubiesen podido pasar desapercibidas clínicamente. Es bien conocido el importante papel que juega la

histopatología en el diagnóstico de enfermedades oculares, sobre todo en aquellas presentaciones con clínica inespecífica. En algunos casos, pequeñas lesiones observadas en histopatología, pueden pasar desapercibidas o inducir cambios clínicos mínimos.<sup>91</sup>

Los resultados histopatológicos confirmaron que, exceptuando la conjuntiva, que se vio alterada con todos los grupos de BAC y significativamente con BAC al 0,05% y al 0,1%, **no hay alteraciones significativas en otras estructuras oculares a parte de la córnea**. A diferencia de lo que ocurrió en la histopatología, las alteraciones conjuntivales se apreciaron clínicamente sólo a partir de concentraciones de 0,1%, lo que nos hace pensar que grados leve de infiltrado linfoplasmocitario no indujeron clínica suficiente como para ser detectados mediante biomicroscopía. Las lesiones conjuntivales observadas en el estudio *in vivo*, concuerdan con estudios previos en el hombre,<sup>85,86,92</sup> donde se describe un efecto pro-apoptótico del BAC sobre las células conjuntivales, reduciendo su viabilidad al incrementar la concentración de BAC.<sup>86</sup> Estas afirmaciones se realizaron tras la aplicación tópica de BAC, por lo que el mecanismo patogénico en el presente estudio podría diferir, siendo la respuesta corneal uno de los motivos de congestión conjuntival.

Los cambios observados en el CE mediante biomicroscopía, microscopía especular y tinciones vitales, no pudieron confirmarse con la histopatología, al **no detectarse diferencias significativas con el grupo BSS en cuanto a pérdida de CECs**. Este hecho podría estar asociado a las fuertes uniones de las células endoteliales a la membrana de Descemet, manteniendo su ubicación a pesar de estar muertas. Curiosamente, la disminución de la densidad endotelial se apreció más marcadamente en algunas zonas

localizadas, pudiendo sugerir muerte selectiva de algunas células en concreto, por causas que desconocemos.

Por lo que respecta a las **roturas ocasionales de membrana de Descemet**, podrían explicarse por la tensión debida a la deformación de la córnea, observada clínicamente, o bien ser simplemente un artefacto ocasionado por el proceso de preparación de las muestras para las tinciones vitales o para la histopatología.

Los datos histopatológicos del estudio, junto con los previamente expuestos apoyan la hipótesis de que la concentración de **BAC al 0,05% cumpliría los requisitos necesarios para inducir el modelo animal objetivo del presente estudio.**

### ***Nuevo modelo de enfermedad endotelial corneal***

Tras evaluar los resultados de los dos estudios obtenidos en la presente tesis doctoral, se confirman las hipótesis y los objetivos marcados, **logrando el desarrollo de un modelo animal de enfermedad endotelial corneal en conejos.** Los estudios biomicroscópicos, paquimétricos e histopatológicos, junto con los de microscopía especular y las tinciones vitales de ambos estudios, demuestran que la ICI de 0,1 ml de BAC al 0,5% destruye selectivamente el CE de forma dosis-dependiente en conejos.

Los **resultados del estudio ex vivo** fueron clave para el diseño del estudio *in vivo*, pudiendo, de esa forma, establecer la dosis inicial del estudio de escalada de dosis. Este hecho sirvió, no solo para optimizar tiempo y recursos, sino también para realizar una actuación éticamente más correcta, evitando aplicar dosis demasiado altas, que pudieran ser excesivamente tóxicas en conejos

vivos. **El estudio *in vivo* validó las observaciones realizadas *ex vivo***, y el conjunto de ambos estudios permitió describir y proponer un nuevo modelo de enfermedad endotelial corneal en conejos. Este modelo representa una alternativa sencilla, repetible y reproducible, a los modelos ya existentes.<sup>21,25,54,57</sup>

La **inyección intracameral de BAC** en conejos fue descrita por primera vez por Swan et al. en 1944 con el objetivo de valorar los efectos de este producto sobre la córnea. Tras testar una cantidad indeterminada de tres concentraciones diferentes de BAC diluidas en NaCl, observaron mediante biomicroscopía, engrosamiento del endotelio, fibrina en cámara anterior y vascularización corneal en las concentraciones de 0,025% y 0,05%.<sup>81</sup> Los estudios de Britton et al. y Maurice et al., caracterizaron posteriormente los efectos de la ICI de BAC diluida en suero salino al 0,9% sobre la córnea, mediante paquimetría e histopatología, observando aumento del espesor y edema corneal.<sup>60,87</sup> Los efectos del BAC, como posible excipiente de productos comerciales, también se han evaluado en córneas de conejos por **vía tópica**.<sup>69,70,73</sup> Estos estudios demostraron que el BAC en concentraciones entre 0,005% y 0,133% no produce lesiones endoteliales evidenciables morfológicamente en corneas sanas,<sup>70</sup> así como tampoco en córneas desepitelizadas.<sup>69</sup> Estos estudios estaban orientados a determinar la dosis segura de BAC para ser utilizado como excipiente en productos comerciales de uso intracameral y tópico, no sugiriendo en ningún momento, su uso como inductor de un modelo de enfermedad endotelial.

Paralelamente, durante las últimas décadas se han realizado diferentes estudios orientados a conseguir un modelo animal de enfermedad endotelial,

mediante técnicas de **congelación transcorneal en gatos y conejos**, **ICI de ortoftalaldehído en conejos** y **desbridado mecánico en primates**.<sup>21,25,54,57</sup>

Cabe remarcar que, a diferencia de nuestro estudio *in vivo*, en el que la selectividad del tóxico por el CE queda patente, los resultados de los estudios de **congelación** indujeron lesiones corneales no selectivas para el CE, afectando a todo el espesor corneal de forma severa. Además, destacar que, el daño endotelial se recuperó totalmente a las 2 semanas, no logrando crear un modelo permanente. En la presente tesis doctoral los efectos endoteliales se mantuvieron durante toda la duración del estudio, confirmando, como mínimo, una mayor duración de los efectos de este modelo animal. La **ICI de ortoftalaldehído en conejos** provocó marcado edema corneal asociado a incremento del grosor corneal secundario, pero no se estudiaron sus efectos directos sobre el endotelio corneal, no pudiéndose proponer como modelo de enfermedad endotelial.<sup>57</sup> El **desbridamiento endotelial en primates** obtuvo muy buen resultado, proponiendo un modelo de enfermedad endotelial en primates. A pesar de que este estudio demuestra la eficacia del desbridamiento en primates, los resultados no pueden extrapolarse a otras especies, sobre todos aquellas, como el conejo, con capacidad regenerativa endotelial. Dada la imposibilidad de eliminar mecánicamente el endotelio corneal en su totalidad, las células restantes, al no estar metabólicamente alteradas, podrían inducir la formación de nuevo endotelio. Cabe añadir, que la técnica quirúrgica es mucho más invasiva que la ICI. Al no poder ser los resultados de esta técnica extrapolados a otras especies de características regenerativas endoteliales diferentes, sigue siendo necesario desarrollar una técnica de inducción de enfermedad endotelial en especies menos evolucionadas. Además, la

realización de esta técnica es mucho más compleja que la propuesta en el presente estudio, y puede que incluso más en conejos, por la diferencia de tamaño del globo ocular y la cámara anterior tan estrecha.

### ***Limitaciones de los estudios***

Los resultados de esta tesis doctoral, no solo validan un procedimiento de inducción de un modelo animal de enfermedad endotelial corneal en el conejo, sino que también caracterizan detalladamente los cambios oculares inducidos por el BAC intracamerar. Sin embargo, hay algunas **limitaciones** que cabe remarcar. Entre ellas, destacar que al tratarse de **estudios en conejos**, la interpretación y extrapolación de los resultados a otras especies debe realizarse con cautela. Además, la duración del estudio (14 días) se fijó basándonos en resultados de estudios anteriores, en los que a las 2 semanas la lesión endotelial ya se había recuperado, quedando únicamente el edema corneal.<sup>25</sup> El objetivo del presente estudio era crear un modelo animal en conejos de mayor duración a los descritos hasta el momento. Este objetivo se ha cumplido, pero lamentablemente sería deseable y totalmente necesario realizar estudios a más largo plazo para poder asegurar, con toda seguridad, que la capacidad regenerativa del CE de los conejos queda totalmente/mayormente anulada mediante esta actuación. En humanos que han sufrido daños en el CE secundarios al uso intraocular del BAC, se ha descrito cierta capacidad de recuperación un año tras la exposición al tóxico.<sup>93</sup> Si se diera el caso de que existe una recuperación pasado un determinado periodo de tiempo, también podría resultar útil como modelo de enfermedad

endotelial con recuperación a medio plazo. Esto podría igualmente tener aplicaciones en investigación.

Cabe también destacar que las valoraciones morfológicas y morfométricas del CE se realizaron exclusivamente a partir de **imágenes de la córnea central**, hecho que puede haber pasado por alto alteraciones que afectasen a los 4 cuadrantes corneales periféricos. Desafortunadamente, tras intentarlo en varias ocasiones, las mediciones periféricas no pudieron llevarse a cabo, principalmente debido al tamaño de los ojos de los conejos, la complejidad del posicionamiento y el manejo de los animales.

---

# CONCLUSIONES

---



1. La inyección intracameral de BAC al 0,5% es un método sencillo, repetible y reproducible de inducción de un **modelo animal de enfermedad endotelial corneal en el conejo**.
2. La dosis de 0,1 ml de BAC 0,05% inyectada por vía intracameral en conejos provoca **daño selectivo sobre el endotelio corneal** sin afectar al resto de estructuras intraoculares.
3. La biomicroscopía, paquimetría, microscopía especular, tinciones vitales y la histopatología son **metodologías adecuadas para evaluar el daño endotelial** producido tras la inyección intracameral de BAC en conejos.
4. Hay **relación directamente proporcional** entre la concentración de BAC inyectada en cámara anterior, y el espesor corneal, la superficie media y mortalidad de las células endoteliales corneales.
5. Hay **relación inversamente proporcional** entre la concentración de BAC inyectada en cámara anterior, y la densidad y hexagonalidad de las células endoteliales de la córnea.



---

# FUTUROS ESTUDIOS

---



En vista de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, sería interesante la realización de futuros estudios, tales como:

- Estudios *in vivo* de evaluación a largo plazo de los efectos tóxicos del BAC sobre el CE en el conejo.
- Estudios *in vivo* en conejos utilizando el modelo descrito para evaluar la eficacia de nuevas técnicas quirúrgicas de reparación del CE.
- Estudios *in vivo* en conejos utilizando el modelo descrito para evaluar la eficacia del trasplante de células madre pluripotenciales endoteliales utilizando diferentes matrices.



---

# RESUMEN

---



**Objetivo:** Hallar una dosis de cloruro de benzalconio (BAC) que, inyectada por vía intracameral en conejos, provoque daño selectivo sobre el endotelio corneal, sin afectar al resto de estructuras intraoculares, creando un modelo animal repetible y reproducible de enfermedad endotelial corneal.

**Materiales y métodos:** Estudio *ex vivo inicial* con 40 ojos de conejo obtenidos post-mortem, que se dividieron en 8 grupos en función del compuesto inyectado por vía intracameral: control (sin inyección), BSS (solución salina balanceada), y concentraciones crecientes de BAC (0,005%, 0,01%, 0,025%, 0,05%, 0,1% y 0,2%). Estudio *in vivo* con 24 conejos, que fueron divididos en 4 grupos: BSS (grupo control) y BAC al 0,025%, 0,05% y 0,1%. Solamente se emplearon conejos sanos y ojos sin alteraciones. Las inyecciones intracamerales se efectuaron en el limbo esclerocorneal utilizando una aguja de 27G. con la ayuda de gafas lupa. En ambos estudios, se realizaron evaluaciones de exploración oftalmológica, paquimetría y microscopía especular (a las 0, 6, 24 y 48 horas en el estudio *ex vivo*; y a los 0, 2, 7 y 14 días en el estudio *in vivo*). A los 14 días, los conejos del estudio *in vivo* fueron eutanasiados. Al final de cada estudio, se realizaron tinciones vitales de las córneas para evaluar la morfología y viabilidad de las células endoteliales corneales (CECs). En el estudio *in vivo* también se hizo histopatología de los globos oculares.

**Resultados:** Estudio ex vivo: Comparado con BSS, la densidad de las CECs comenzó a disminuir de manera significativa a la concentración de BAC 0,025%, mientras que la superficie de las CECs, el grado de edema corneal y el espesor corneal aumentaron de forma significativa con BAC al 0,05%, 0,005% y 0,1%, respectivamente. Concentraciones de BAC al 0,05% y

superiores ocasionaron aumentos significativos en la mortalidad y el pleomorfismo de las CECs, en comparación con el control y BSS. Estudio in vivo: Comparado con el BSS, concentraciones de BAC al 0,025% y superiores provocaron aumento significativo en el grado de edema y espesor corneales, y en la superficie y el polimegatismo de las CECs. La mortalidad de las CECs fue significativamente mayor a partir de BAC 0,05%. La densidad y hexagonalidad de las CECs disminuyeron significativamente en todos los grupos de BAC. BAC al 0,1% ocasionó mayor número de casos de congestión conjuntival y úlceras corneales. La histopatología no reveló alteraciones significativas que afectasen al resto de las estructuras oculares tras la inyección de BAC.

**Conclusiones:** La inyección intracameral de 0,1 ml de BAC al 0,05% en conejos provoca daño selectivo sobre el endotelio corneal, sin afectar al resto de estructuras intraoculares. Esta técnica, desarrollada y validada en un estudio *ex vivo* y otro *in vivo*, puede utilizarse para inducir un modelo animal repetible y reproducible de enfermedad endotelial corneal en conejos.

---

# SUMMARY

---



**Objective:** Find a dose of benzalkonium chloride (BAC) which, injected into the anterior chamber in rabbits, causes a selective damage on the corneal endothelium, without affecting the rest of intraocular structures and thus can be used to induce a repeatable and reproducible animal model of corneal endothelial disease.

**Material and Methods:** First, an *ex vivo* study was performed using 40 rabbit eyes obtained postmortem, which were classified into 8 groups depending on the injected compound: Control (no injection), Balance salt solution (BSS), and increasing concentrations of BAC (0.005%, 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1% and 0.2%). Secondly, an *in vivo* study was performed using 24 New Zealand White rabbits, which were classified into 4 groups: BSS (control group); and 0.025%, 0.05% and 0.1% BAC. Only healthy rabbits and eyes without abnormalities were used. The intracameral injections were made at the corneoscleral limbus using a 27G needle and magnifying loupes. In both studies, follow-up assessments of ophthalmological examination, pachymetry and specular microscopy were performed (at 0, 6, 24 and 48 hours in the *ex vivo* study; and at 0, 2, 7 and 14 days in the *in vivo* study). Fourteen days after injection, the rabbits from the *in vivo* study were euthanized. At the end of each study, corneas were vital-stained and evaluated under the light microscope in order to assess the morphology and viability of the corneal endothelial cells (CECs). In the *in vivo* study, histopathology of the eye globes was also performed.

**Results: Ex vivo study:** Compared to BSS, the CECs density began to decrease significantly with 0.025% BAC, while the CECs area, the degree of corneal edema and the corneal thickness increased significantly with 0.05%, 0.005% and 0.1% BAC, respectively. BAC concentrations of 0.05% and above

caused significant increases in CECs mortality and pleomorphism, compared to control and BSS. ***In vivo study:*** Compared to BSS, concentrations of 0.025% BAC and above caused a significant increase in the degree of corneal edema and corneal thickness, and in CECs area and polymeghetism. CECs mortality was significantly higher with 0.05% BAC and above concentrations. The CECs density and hexagonality decreased significantly in all BAC groups. A concentration of 0.1% BAC resulted in a higher number of cases presenting with conjunctival congestion and corneal ulcers. Histopathology revealed no significant alterations affecting the rest of the ocular structures after BAC injection.

**Conclusions:** Intracameral injection of 0.1 ml 0.05% BAC in rabbits causes a selective damage on the corneal endothelium, without affecting the rest of intraocular structures. This technique, developed and validated in an *ex vivo* and an *in vivo* study, could be used to induce a repeatable and reproducible animal model of endothelial corneal disease in rabbits.

---

# ANEXOS

---



**Anexo 1:** Hoja de exploración oftalmológica.



**REVISIÓN OFTALMOLÓGICA PREQUIRÚRGICA**

Fecha: / /

**Datos animal**

ANIMAL .....

**OD**

**OS**

Comentarios

Comentarios

.....  
 .....  
 .....

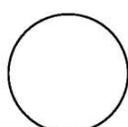


PÁRPADOS  
 AP. LACRIMAL  
 CONJUNTIVA

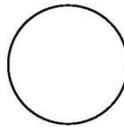


.....  
 .....  
 .....

.....  
 .....  
 .....

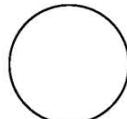


CÓRNEA

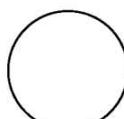


.....  
 .....  
 .....

.....  
 .....  
 .....



IRIS

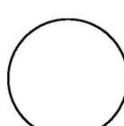


.....  
 .....  
 .....

.....  
 .....  
 .....

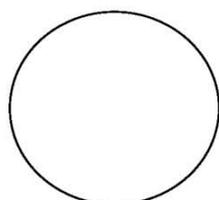


CRISTALINO

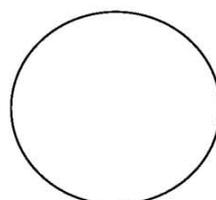


.....  
 .....  
 .....

.....  
 .....  
 .....



FONDO OCULAR



.....  
 .....  
 .....

VITREO

S	N	.....	R. PALPEBRAL	S	N	.....
S	N	.....	R. AMENAZA	S	N	.....
S	N	.....	D PLR	S	N	.....
S	N	.....	I PLR	S	N	.....
..... mm Hg			IOP	..... mm Hg		

OFTFOF 13-01

## Anexo 2: Hoja de seguimiento para el estudio ex vivo.

ESTUDI *EX VIVO* D'ESCALADA DE DOSI DE CLORUR DE BENZALCONI  
EN ULLS DE CONILL: DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL ANIMAL  
DE PATOLOGIA ENDOTELIAL

ID: .....  
Grup: .....

### PAQUIMETRIA / MICROSCOPIA ESPECULAR

#### FULL DE SEGUIMENT:

**AVALUACIÓ PRÈVIA** (Hora 0). Data: ...../...../..... Hora: ..... : .....

**Paquimetria:**  
-Mesuraments: 1: .....  $\mu\text{m}$ . 2: .....  $\mu\text{m}$ . 3: .....  $\mu\text{m}$ . -Mitjana: .....  $\mu\text{m}$ .

**Microscopia especular:**  
-Densitat de cèl·lules endotelials corneals: ..... cèl·lules/ $\text{mm}^2$ .  
-Superfície mitjana de les cèl·lules endotelials corneals: .....  $\mu\text{m}^2$ .

**Grau d'edema corneal:**  0  +1  +2  +3  +4

**Observacions:** .....

**AVALUACIÓ 2** (6h post-injecció). Data: ...../...../..... Hora: ..... : .....

**Paquimetria:**  
-Mesuraments: 1: .....  $\mu\text{m}$ . 2: .....  $\mu\text{m}$ . 3: .....  $\mu\text{m}$ . -Mitjana: .....  $\mu\text{m}$ .

**Microscopia especular:**  
-Densitat de cèl·lules endotelials corneals: ..... cèl·lules/ $\text{mm}^2$ .  
-Superfície mitjana de les cèl·lules endotelials corneals: .....  $\mu\text{m}^2$ .

**Grau d'edema corneal:**  0  +1  +2  +3  +4

**Observacions:** .....

**AVALUACIÓ 3** (24 h post-injecció). Data: ...../...../..... Hora: ..... : .....

**Paquimetria:**  
-Mesuraments: 1: .....  $\mu\text{m}$ . 2: .....  $\mu\text{m}$ . 3: .....  $\mu\text{m}$ . -Mitjana: .....  $\mu\text{m}$ .

**Microscopia especular:**  
-Densitat de cèl·lules endotelials corneals: ..... cèl·lules/ $\text{mm}^2$ .  
-Superfície mitjana de les cèl·lules endotelials corneals: .....  $\mu\text{m}^2$ .

**Grau d'edema corneal:**  0  +1  +2  +3  +4

**Observacions:** .....

**AVALUACIÓ 4** (48h post-injecció). Data: ...../...../..... Hora: ..... : .....

**Paquimetria:**  
-Mesuraments: 1: .....  $\mu\text{m}$ . 2: .....  $\mu\text{m}$ . 3: .....  $\mu\text{m}$ . -Mitjana: .....  $\mu\text{m}$ .

**Microscopia especular:**  
-Densitat de cèl·lules endotelials corneals: ..... cèl·lules/ $\text{mm}^2$ .  
-Superfície mitjana de les cèl·lules endotelials corneals: .....  $\mu\text{m}^2$ .

**Grau d'edema corneal:**  0  +1  +2  +3  +4

**Observacions:** .....

### Anexo 3: Hoja de seguimiento para el estudio *in vivo*.

DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL DE PATOLOGIA ENDOTELIAL EN CONILLS  
MITJANÇANT LA INJECCIÓ INTRACAMERAL DE CLORUR DE BENZALCONI:  
ESTUDI *IN VIVO*

ID: .....  
Grup: .....

#### PAQUIMETRIA / MICROSCOPIA ESPECULAR / EDEMA CORNEAL

#### FULL DE SEGUIMENT:

**AVALUACIÓ PREQUIRÚRGICA** (Dia 0) . Pes: .....Kg. Data: ...../...../.....

T: ..... / ..... / .....; **AVG:** ..... / ..... / .....; **CV:** ..... / ..... / .....; **CD:** ..... / ..... / .....  
Mitjana **CCT:** .....; Mitjana **MCA:** .....; Mitjana **Polymeg:** .....; Mitjana **ECD:** .....

**Grau d'edema corneal:**  0  +1  +2  +3  +4

**Anestèsia:** .....mg butorf .....mg midaz .....mg keta .....mg medetom Isoflorà:  No  Sí, .....min

**Observacions:** .....

**AVALUACIÓ 2** (Dia 2 post-injecció). Pes: .....Kg. Data: ...../...../.....

T: ..... / ..... / .....; **AVG:** ..... / ..... / .....; **CV:** ..... / ..... / .....; **CD:** ..... / ..... / .....  
Mitjana **CCT:** .....; Mitjana **MCA:** .....; Mitjana **Polymeg:** .....; Mitjana **ECD:** .....

**Grau d'edema corneal:**  0  +1  +2  +3  +4

**Anestèsia:** .....mg butorf .....mg midaz .....mg keta .....mg medetom Isoflorà:  No  Sí, .....min

**Observacions:** .....

**AVALUACIÓ 3** (Dia 7 post-injecció). Pes: .....Kg. Data: ...../...../.....

T: ..... / ..... / .....; **AVG:** ..... / ..... / .....; **CV:** ..... / ..... / .....; **CD:** ..... / ..... / .....  
Mitjana **CCT:** .....; Mitjana **MCA:** .....; Mitjana **Polymeg:** .....; Mitjana **ECD:** .....

**Grau d'edema corneal:**  0  +1  +2  +3  +4

**Anestèsia:** .....mg butorf .....mg midaz .....mg keta .....mg medetom Isoflorà:  No  Sí, .....min

**Observacions:** .....

**AVALUACIÓ 4** (Dia 14 post-injecció). Pes: .....Kg. Data: ...../...../.....

T: ..... / ..... / .....; **AVG:** ..... / ..... / .....; **CV:** ..... / ..... / .....; **CD:** ..... / ..... / .....  
Mitjana **CCT:** .....; Mitjana **MCA:** .....; Mitjana **Polymeg:** .....; Mitjana **ECD:** .....

**Grau d'edema corneal:**  0  +1  +2  +3  +4

**Anestèsia:** .....mg butorf .....mg midaz .....mg keta .....mg medetom Isoflorà:  No  Sí, .....min

**Observacions:** .....

**Anexo 4:** Tabla de aleatorización de ojo inyectado en estudio *in vivo*.

<b>Ojo a inyectar</b>	<b>Conejo</b>
OD	101
OS	107
OD	108
OD	109
OS	110
OS	111
OD	201
OS	202
OD	203
OD	204
OS	205
OS	206
OS	301
OD	302
OD	303
OD	304
OS	305
OS	306
OS	401
OD	402
OS	403
OD	404
OS	405
OD	406

**OS:** Ojo izquierdo

**OD:** Ojo derecho

**Anexo 5:** Hoja de hospitalización para los conejos del estudio *in vivo*.



**HOSPITALITZACIÓ D'EXÒTICS**



Data: / / 2013 Dia d'hospitalització:

<b>Nom/ID</b>		<b>Propietari</b>	Oftalmologia	<b>Motiu</b>
<b>Espècie</b>	Conill	<b>Telefon</b>	6925	Exp
<b>Edat / Sexe</b>		<b>Veterinari</b>	Marta Leiva	

PV avui:

PV ahir:

**MEDICACIONS**

(especificar nom comercial, fàrmac i dosi)	Hores	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8
Si sedació: administrar aliment Intensive Care																									

Si sedació: administrar 2mg/kg Ranitidina i 0,5mg/kg Primperan SC 3 vegades / dia

**NUTRICIÓ**

(Pauta: Cada 24 hores). Revisar quantitat d'aigua disponible! (*ad libitum*)

Hora:

Aliment: Pinso  Fenc  Altres (especificar què!): \_\_\_\_\_

Volum:

Observacions:

CONTROL DE GÀBIA		
HORA	10h	18h
Femtes		
Orina		
Neteja Gàbia		
Control T <sup>a</sup>		
Control Llum		
Altres:		

EXAMEN FÍSIC GENERAL		
HORA	10h	18h
Estat mental		
Pes		
Condió Corporal		
Pelatge		
Hidratació		
Mucoses		
FC / FR		
T <sup>a</sup>		
Pols / PAS		
Palpació abdominal		

**OBSERVACIONS**

Hora	Comentari	Signatura

## Anexo 6: Hoja de evaluación del dolor para el estudio *in vivo*.

ESTUDI D'ESCALADA DE DOSI DE CLORUR DE BENZALCONI EN CONILLS:  
 DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL ANIMAL DE PATOLOGIA ENDOTELIAL

ID: .....  
 Grup: .....

### PROTOCOL DE SUPERVISIÓ DEL DOLOR OCULAR

PRIMERA AVALUACIÓ (Dia 1)	Data: .../.../.....	
	Mati	Tarda
1. Presencia de blefaroespasmе: 0=no, 1=lleu, 2=moderat, 3= sever.		
2. Presencia de congestió conjuntival: 0=no 2=lleu, 2=moderat, 3=sever.		
3. Pressió intraocular: 0= < 15, 1=(15-20), 2=(21-25), 3=>26mmHg.		
4. Ingestió d'aliments i d'aigua: si=0; si però menys quantitat=2; no=3		
5. Postures anormals, massa temps ajagut: no=0; si=3.		
6. Miccions/defecacions: normals =0; anormals (diarrea, femtes/orina anormals) = 3		
7. Control de la temperatura: normal =0, hipertèrmia = 3		
8. Control de les mucoses i temps de ompliment capil·lar: normal =0, anormal (pal·lidesa, temps ompliment capil·lar >2 segons) = 3		
VALOR TOTAL		

SEGONA AVALUACIÓ (Dia 2)	Data: .../.../.....	
	Mati	Tarda
1. Presencia de blefaroespasmе: 0=no, 1=lleu, 2=moderat, 3= sever.		
2. Presencia de congestió conjuntival: 0=no 2=lleu, 2=moderat, 3=sever.		
3. Pressió intraocular: 0= < 15, 1=(15-20), 2=(21-25), 3=>26mmHg.		
4. Ingestió d'aliments i d'aigua: si=0; si però menys quantitat=2; no=3		
5. Postures anormals, massa temps ajagut: no=0; si=3.		
6. Miccions/defecacions: normals =0; anormals (diarrea, femtes/orina anormals) = 3		
7. Control de la temperatura: normal =0, hipertèrmia = 3		
8. Control de les mucoses i temps de ompliment capil·lar: normal =0, anormal (pal·lidesa, temps ompliment capil·lar >2 segons) = 3		
VALOR TOTAL		

TERCERA AVALUACIÓ (Dia 3)	Data: .../.../.....	
	Mati	Tarda
1. Presencia de blefaroespasmе: 0=no, 1=lleu, 2=moderat, 3= sever.		
2. Presencia de congestió conjuntival: 0=no 2=lleu, 2=moderat, 3=sever.		
3. Pressió intraocular: 0= < 15, 1=(15-20), 2=(21-25), 3=>26mmHg.		
4. Ingestió d'aliments i d'aigua: si=0; si però menys quantitat=2; no=3		
5. Postures anormals, massa temps ajagut: no=0; si=3.		
6. Miccions/defecacions: normals =0; anormals (diarrea, femtes/orina anormals) = 3		
7. Control de la temperatura: normal =0, hipertèrmia = 3		
8. Control de les mucoses i temps de ompliment capil·lar: normal =0, anormal (pal·lidesa, temps ompliment capil·lar >2 segons) = 3		
VALOR TOTAL		

## Anexo 7: Tablas de resultados del estudio ex vivo.

### Paquimetría, microscopía especular y edema corneal.

Grupo	Ojo	CCT 00h	ECD 00h	MCA 00h	Edema C 00h	CCT 06h	ECD 06h	MCA 06h	Edema C 06h	CCT 24h	ECD 24h	MCA 24h	Edema C 24h	CCT 48h	ECD 48h	MCA 48h	Edema C 48h
Control	E501-2	415	3198	311	0	493	3304	276	0	581	3103	324	+1	674	3185	314	+2
	E502-2	485	4165	240	0	539	3611	260	0	583	3896	258	+1	619	4060	246	+2
	E503-2	423	3583	279	0	499	2898	346	0	557	3397	295	+1	638	3861	261	+2
	E504-2	438	3367	307	0	539	3399	295	0	585	3309	305	+1	693	3463	291	+1
	E505-2	409	3097	323	0	532	3100	323	0	600	2562	393	+1	661	3553	282	+1
BSS	E101-2	546	3304	305	0	642	3931	256	0	685	3476	287	+2	746	3741	274	+2
	E102-2	493	3286	305	0	541	3246	298	0	684	NO	NO	NO	NO	NO	NO	+2
	E103-2	590	3200	314	0	700	4240	236	0	720	3869	258	+2	778	3885	261	+2
	E104-2	623	3552	282	0	700	4240	236	0	774	3408	327	+2	NO	NO	NO	+2
	E105-2	627	3361	298	+1	607	3548	283	+1	683	2975	304	+1	824	2723	379	+2
0,005 BAC	E801-2	399	3915	255	0	485	4360	230	0	504	4187	239	+1	597	3617	281	+1
	E802-2	428	4474	224	0	456	4722	212	0	528	4175	240	+1	608	4045	248	+1
	E803-2	421	4610	217	0	484	4848	206	0	549	4367	229	+1	632	2783	360	+2
	E804-2	449	3587	279	0	516	3620	275	0	670	3500	285	+1	799	2969	340	+1
	E805-2	459	3644	274	0	493	3304	275	0	682	3604	278	+1	730	3272	306	+1
0,01 BAC	E701-2	402	4418	226	0	443	3693	271	0	539	3873	258	+1	629	3366	314	+1
	E702-2	406	4179	239	0	466	4261	235	0	550	3334	300	+1	611	3897	266	+1
	E703-2	408	4066	247	0	503	4160	238	0	585	3454	290	+1	697	3779	266	+1
	E704-2	460	4021	249	0	609	4192	240	0	758	3501	289	+1	933	NO	NO	+2
	E705-2	378	3935	254	0	465	3737	267	0	577	3744	267	+1	664	3865	259	+1
0,025 BAC	E601-2	447	3822	262	0	579	3089	325	+1	700	NO	NO	+1	802	2949	339	+2
	E602-2	367	3856	260	0	436	3776	265	+1	508	3141	320	+1	593	3544	281	+1
	E603-2	350	3916	255	0	463	3877	259	0	540	3487	292	+1	649	3113	325	+1
	E604-2	369	4183	239	0	482	3527	286	+1	618	4050	247	+1	777	2704	369	+1
	E605-2	400	4233	236	0	402	3514	286	+1	476	4216	237	+1	623	4093	245	+1
0,05% BAC	E401	426	3603	278	0	787	3336	299	+1	NO	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+3
	E402	409	3623	282	0	528	NO	NO	+1	NO	NO	NO	+2	NO	NO	NO	+3
	E403	454	3515	285	0	NO	NO	NO	+2	NO	NO	NO	+4	NO	NO	NO	+4
	E404	457	3790	284	0	884	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+4
	E405	463	3370	296	0	575	3260	307	+1	587	3065	330	+2	NO	NO	NO	+3
0,1% BAC	E201	622	3362	299	0	NO	NO	NO	+2	NO	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+3
	E202	630	3808	262	0	765	NO	NO	+1	NO	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+4
	E203	590	3695	270	0	NO	NO	NO	+1	NO	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+3
	E204	579	3585	279	0	789	NO	NO	+2	NO	NO	NO	+3	947	NO	NO	+3
	E205	523	3544	282	0	783	NO	NO	+1	NO	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+3
0,2% BAC	E301	484	3327	302	0	NO	NO	NO	+2	NO	NO	NO	+4	NO	NO	NO	+4
	E302	442	3304	306	0	939	NO	NO	+4	NO	NO	NO	+4	NO	NO	NO	+4
	E303	467	3172	315	0	NO	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+4	NO	NO	NO	+4
	E304	505	3085	324	0	NO	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+4	NO	NO	NO	+4
	E305	451	3524	284	0	658	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+3	NO	NO	NO	+4

CCT: Central Corneal Thickness (espesor corneal)

ECD: Endothelial cell density (densidad)

MCA: Mean Cell Area (superficie)

Edema: Edema corneal

NO: no es posible obtener un valor.

### Hexagonalidad y mortalidad de las CECs a las 48h.

Grupo	Ojo	% Hexag OBS 1	% Mortal OBS 1	% Hexag OBS 2	% Mortal OBS 2
<b>Control</b>	E501-2	56,7	Baja	72,2	Baja
	E502-2	58,3	Baja	51,7	Baja
	E503-2	62,2	Baja	70,0	Baja
	E504-2	66,7	Baja	68,9	Baja
	E505-2	63,3	Baja	70,0	Baja
<b>BSS</b>	E101-2	66,7	Baja	74,4	Baja
	E102-2	64,4	Baja	58,9	Baja
	E103-2	60,0	Baja	65,6	Baja
	E104-2	70,0	Baja	81,1	Baja
	E105-2	62,2	Baja	64,4	Baja
<b>0,005 BAC</b>	E801-2	30,0	Baja	33,3	Baja
	E802-2	45,6	Baja	46,7	Baja
	E803-2	37,8	Baja	51,7	Baja
	E804-2	46,7	Media	40,0	Media
	E805-2	46,7	Baja	57,8	Baja
<b>0,01 BAC</b>	E701-2	NO	NO	NO	NO
	E702-2	62,2	Baja	61,1	Baja
	E703-2	71,7	Baja	68,3	Baja
	E704-2	50,0	Media	38,3	Media
	E705-2	64,4	Baja	63,3	Baja
<b>0,025 BAC</b>	E601-2	71,7	Baja	71,7	Baja
	E602-2	64,4	Baja	74,4	Baja
	E603-2	68,3	Baja	63,3	Baja
	E604-2	73,3	Baja	81,1	Baja
	E605-2	no	Media	no	Media
<b>0,05% BAC</b>	E401	0,0	Alta	0,0	Alta
	E402	0,0	Media	NO	Alta
	E403	0,0	Alta	0,0	Alta
	E404	0,0	Alta	0,0	Alta
	E405	48,9	Baja	57,8	Baja
<b>0,1% BAC</b>	E201	63,3	NO	56,7	NO
	E202	NO	NO	0,0	NO
	E203	NO	Alta	0,0	Alta
	E204	NO	Alta	0,0	Alta
	E205	0,0	Alta	0,0	Alta
<b>0,2% BAC</b>	E301	NO	Alta	0,0	Alta
	E302	0,0	Alta	0,0	Alta
	E303	0,0	Alta	0,0	Alta
	E304	0,0	Alta	0,0	Alta
	E305	0,0	Alta	0,0	Alta

**OBS:** observador

**%Hexag:** Porcentaje hexagonalidad (pleomorfismo)

**%Mortal:** Porcentaje mortalidad (**BAJA**= 0-33%; **MEDIA**= 34-66%; **ALTA**= 67-100%)

**NO:** no es posible obtener un valor.

## Anexo 8: Tablas de resultados del estudio *in vivo*.

### Paquimetría y microscopía especular.

Grupo	Ojo	investigado	Conjelo	CCT.00d	ECD.00d	MCA.00d	CV.00d	CCT.02d	ECD.02d	MCA.02d	CV.02d	CCT.07d	ECD.07d	MCA.07d	CV.07d	CCT.14d	ECD.14d	MCA.14d	CV.14d	
BSS	OD	1101	329	3136	322	34	326	3093	326	326	40	341	3172	270	30	334	3507	320	29	
	OS	1107	374	2955	340	39	337	2974	337	337	45	338	2950	348	37	360	2809	357	33	
	OD	1108	317	3071	326	37	305	3271	306	306	29	311	3085	324	24	320	2958	338	38	
	OD	1109	321	2825	357	46	321	3274	223	223	42	306	2886	347	35	341	3161	350	35	
	OS	1110	301	3317	303	42	298	3464	290	290	33	326	3213	313	42	325	2883	356	41	
0,025% BAC	OS	1111	321	3638	275	32	315	3125	322	322	28	316	3344	302	47	396	2798	357	27	
	OD	1201	353	3777	297	40	470	NO	NO	NO	NO	414	NO	NO	NO	352	NO	NO	NO	
	OS	1202	356	2837	357	37	NO	NO	NO	NO	NO	NO	686	NO	NO	NO	490	NO	NO	NO
	OD	1203	307	2972	337	41	560	NO	NO	NO	NO	326	1730	579	36	300	2063	485	27	
	OD	1204	311	2953	342	45	524	NO	NO	NO	NO	330	NO	NO	NO	NO	274	NO	NO	NO
0,05% BAC	OS	1205	315	3581	280	38	497	NO	NO	NO	NO	309	NO	NO	NO	315	2595	385	19	
	OS	1206	309	3110	322	41	335	NO	NO	NO	NO	335	NO	NO	NO	322	2716	373	30	
	OS	1301	298	3095	325	23	NO	NO	NO	NO	NO	494	NO	NO	NO	365	2220	456	34	
	OD	1302	314	2939	341	38	NO	NO	NO	NO	NO	501	NO	NO	NO	492	1243	804	31	
	OD	1303	323	2623	381	30	NO	NO	NO	NO	NO	497	NO	NO	NO	508	1804	795	47	
0,1% BAC	OD	1304	329	2885	354	38	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	740	1693	603	39	
	OS	1305	325	2955	341	40	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	492	NO	NO	NO	
	OS	1306	389	2730	351	28	792	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	490	NO	NO	NO	
	OS	1401	321	2664	378	32	NO	NO	NO	NO	NO	NO	820	NO	NO	673	NO	NO	NO	
	OD	1402	300	2641	277	30	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
0,1% BAC	OS	1403	366	2818	356	26	896	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	751	NO	NO	NO	
	OD	1404	314	3174	318	26	NO	NO	NO	NO	NO	402	2433	413	27	324	2248	445	13	
	OS	1405	343	2692	312	39	827	NO	NO	NO	NO	920	NO	NO	NO	905	NO	NO	NO	
	OD	1406	322	2960	340	41	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	759	NO	NO	NO	

OS: Ojo izquierdo

OD: Ojo derecho

CCT: Central Corneal Thickness (espesor corneal)

ECD: Endothelial cell density (densidad)

MCA: Mean Cell Area (superficie)

CV: Coefficient of variation (coeficiente variación: variaciones en tamaño - polimegatismo)

NO: no es posible obtener un valor.

## Exploración oftalmológica.

Grupo	Ojo	Investigado	ConjC	00d	IOP	OS	00d	IOP	OD	00d	Edema	00d	ConjC	02d	IOP	OS	02d	IOP	OD	02d	Edema	02d	ConjC	07d	IOP	OS	07d	IOP	OD	07d	Edema	07d	ConjC	14d	IOP	OS	14d	IOP	OD	14d	Edema	14d	Úlcera	Catarata	Fibrina									
B.S.S	OD	H101	0	12	11	0	0	11	19	0	0	0	0	13	15	0	0	12	12	12	0	0	0	0	12	12	12	12	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	OS	H107	0	15	12	0	0	13	14	0	0	0	0	6	9	0	0	15	14	14	0	0	0	0	15	14	14	14	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	OD	H108	0	10	9	0	0	9	10	0	0	0	0	9	9	0	0	12	13	13	0	0	0	0	12	13	13	13	13	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
	OS	H109	0	10	9	0	0	8	6	0	0	0	0	9	9	0	0	10	10	10	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	OD	H110	0	14	11	0	1	11	12	0	0	0	0	9	10	0	0	13	13	13	0	0	0	0	13	13	13	13	13	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
	OS	H111	0	11	11	0	1	9	9	0	0	0	0	10	11	0	0	16	15	15	0	0	0	0	16	15	15	15	15	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	OD	E201	0	10	9	0	2	6	9	0	+3	0	0	10	13	0	0	14	17	17	0	0	0	0	14	17	17	17	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
	OS	E202	0	10	9	0	1	3	6	0	+3	0	1	12	11	0	0	17	14	14	0	0	0	0	17	14	14	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
0.025%	OD	E203	0	8	10	0	2	6	7	0	+2	0	0	14	9	0	0	13	13	13	0	0	0	0	13	13	13	13	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
BAC	OD	E204	0	12	10	0	1	13	11	0	+2	0	0	11	9	0	0	10	10	10	0	0	0	0	10	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	OS	E205	0	10	10	0	1	11	9	0	+2	0	0	9	11	0	0	11	14	14	0	0	0	0	11	14	14	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	OS	E206	0	18	13	0	1	11	13	0	+2	0	0	13	14	0	0	11	13	13	0	0	0	0	11	13	13	13	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	OS	B301	0	12	14	0	2	10	15	0	+3	1	1	11	12	0	0	11	11	11	0	0	0	0	11	11	11	11	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	OD	B302	0	12	13	0	1	12	11	0	+3	0	0	13	11	0	0	13	11	11	0	0	0	0	13	11	11	11	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.05%	OD	E303	0	14	10	0	1	11	9	0	+3	0	0	13	11	0	0	13	11	11	0	0	0	0	13	11	11	11	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	OD	B304	0	11	16	0	1	13	10	0	+3	0	0	12	10	0	0	12	10	10	0	0	0	0	12	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	OS	E305	0	14	17	0	2	6	15	0	+2	1	1	9	11	0	0	15	15	15	0	0	0	0	15	15	15	15	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	OS	E306	0	15	13	0	2	13	16	0	+3	1	1	11	18	0	0	11	18	18	0	0	0	0	11	18	18	18	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	OS	H401	0	19	11	0	2	9	12	0	+3	2	2	13	12	0	0	13	14	14	0	0	0	0	13	14	14	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	OD	H402	0	13	15	0	2	14	13	0	+3	2	2	15	14	0	0	15	14	14	0	0	0	0	15	14	14	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.1%	OS	H403	0	16	11	0	3	9	11	0	+3	3	3	9	13	0	0	9	13	13	0	0	0	0	9	13	13	13	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BAC	OD	H404	0	11	11	0	3	18	6	0	+3	2	2	14	9	0	0	14	9	9	0	0	0	0	14	9	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	OS	H405	0	10	16	0	3	7	15	0	+3	3	3	10	14	0	0	10	14	14	0	0	0	0	10	14	14	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OD	H406	0	13	18	0	3	13	7	0	+3	2	2	15	10	0	0	15	19	19	0	0	0	0	15	19	19	19	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

OS: Ojo izquierdo  
 OD: Ojo derecho  
 ConjC: Congestión conjuntival  
 IOP OS: IntraOcular Pressure (presión intraocular) ojo izquierdo  
 IOP OD: IntraOcular Pressure (presión intraocular) ojo derecho  
 Edema: Edema corneal  
 Úlcera: presencia de úlcera corneal en ojo intervenido tras inyección (1 = Sí / 0 = NO)  
 Catarata: formación de catarata el ojo intervenido tras inyección (1 = Sí / 0 = NO)  
 Fibrina: presencia de fibrina en cámara anterior del ojo intervenido tras inyección (1 = Sí / 0 = NO)

### Hexagonalidad y mortalidad de las CECs a los 14d.

Grupo	Ojo inyectado	Conejo	%Hexag 14d	%Mortal 14d
<b>BSS</b>	OD	I101	85,0	Baja
	OS	I107	85,0	Baja
	OD	I108	80,0	Baja
	OD	I109	75,0	Baja
	OS	I110	85,0	Baja
	OS	I111	63,3	Baja
<b>0,025% BAC</b>	OD	I201	71,1	Baja
	OS	I202	38,3	Media
	OD	I203	45,0	Media
	OD	I204	43,3	Media
	OS	I205	60,0	Baja
	OS	I206	55,0	Baja
<b>0,05% BAC</b>	OS	I301	15,0	Alta
	OD	I302	42,2	Media
	OD	I303	10,0	Alta
	OD	I304	13,3	Alta
	OS	I305	10,0	Alta
	OS	I306	15,0	Alta
<b>0,1% BAC</b>	OS	I401	15,0	Alta
	OD	I402	15,0	Alta
	OS	I403	0,0	Alta
	OD	I404	5,6	Alta
	OS	I405	0,0	Alta
	OD	I406	0,0	Alta

**OS:** Ojo izquierdo

**OD:** Ojo derecho

**%Hexag:** Porcentaje hexagonalidad (pleomorfismo)

**%Mortal:** Porcentaje mortalidad (**BAJA**= 0-33%; **MEDIA**= 34-66%; **ALTA**= 67-100%)

## Histopatología.

Grupo	Ojo inyectado	Conejo	Endotelio	Conjuntivitis
<b>BSS</b>	OD	I101	3+	0
	OS	I107	1+	1+
	OD	I108	2+	2+
	OD	I109	4+	0
	OS	I110	2+	1+
	OS	I111	3+	0
<b>0,025% BAC</b>	OD	I201	2+	1+
	OS	I202	2+	3+
	OD	I203	1+	1+
	OD	I204	4+	1+
	OS	I205	4+	3+
	OS	I206	3+	2+
<b>0,05% BAC</b>	OS	I301	2+	3+
	OD	I302	1+	1+
	OD	I303	2+	3+
	OD	I304	3+	2+
	OS	I305	2+	2+
	OS	I306	1+	2+
<b>0,1% BAC</b>	OS	I401	1+	2+
	OD	I402	3+	3+
	OS	I403	2+	3+
	OD	I404	1+	2+
	OS	I405	2+	1+
	OD	I406	2+	2+

**OS:** Ojo izquierdo

**OD:** Ojo derecho

**Endotelio:** Grado de pérdida de CECs de 1+ (sin pérdida de CECs o pérdida mínima) a 4+ (marcada reducción del número de CECs)

**Conjuntivitis:** 0 (ausencia) a 3+ (conjuntivitis severa)



---

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



1. Ofri R. Development and Congenital Abnormalities. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008:20-32.
2. Cook CS. Ocular Embryology and Congenital Malformations. In: *Kirk N. Gelatt Veterinary Ophthalmology*. New York: Wiley-Blackwell; 2007:3-38.
3. Zavala J, López Jaime GR, Rodríguez Barrientos CA, Valdez-Garcia J. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye*. 2013;27(5):579-588.
4. Maggs DJ. Cornea and Sclera. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008:175-202.
5. Mimura T, Yamagami S. Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(9):3128-3135.
6. Joyce N. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22(3):359-389.
7. Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res*. 2005;81(6):629-638.
8. Solomon A. Corneal Epithelial Adhesion Disorders. In: *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*. Elsevier; 2013:195-203.
9. Merindano M, Costa J, Canals M. A comparative study of Bowman's layer in some mammals: relationships with other constituent corneal structures. *Eur J Anat*. 2002;6(3):133-139.
10. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778-1785.
11. Dawson DG, Geroski DH, Edelhauser HF. Corneal endothelium: structure and function in health and disease. In: *Corneal Surgery. Theory, Technique and Tissue*. Elsevier; 2009:57-70.

12. Crispin S. The cornea. In: *BSAVA Manual of Small Animal Ophthalmology*. Second. Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2006:134-154.
13. Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM, Rigueiro MP, Smith RL. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Vet Ophthalmol*. 2006;9(2):101-107.
14. Dubielzig RR, Ketring K, McLellan GJ, Albert DM. Diseases of the cornea and sclera. In: *Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review*. New York: Saunders Elsevier; 2010:201-243.
15. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye*. 2003;17(8):912-918.
16. Collin SP, Collin HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clin Exp Optom*. 1998;81(6):245-254.
17. Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res*. 2012;95(1):2-7.
18. Bourne WM, Hodge DO, McLaren JW. Estimation of corneal endothelial pump function in long-term contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(3):603-611.
19. Giuliano EA. Diseases and Surgery of the Canine Lacrimal Secretory System. In: *Kirk N. Gelatt Veterinary Ophthalmology*. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2007:976-1049.
20. Neaderland M, Riis R. Healing of experimentally induced corneal ulcers in horses. *Am J Vet Res*. 1987;48(3):427-430.
21. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977;16(7):597-613.
22. Takács L, Tóth E, Berta A, Vereb G. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry*. 2009;75(1):54-66.

23. Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res.* 2013;35:1-17.
24. Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC, Albuquerque L, Laus JL. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Vet Ophthalmol.* 2010;13(4):222-226.
25. Minkowski JS, Bartels SP, Delori FC, Lee SR, Kenyon KR, Neufeld AH. Corneal endothelial function and structure following cryo-injury in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25(12):1416-1425.
26. Bercht BS, Albuquerque L, Araujo ACP, Pigatto JAT. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Vet Ophthalmol.* 2014:1-6.
27. Coyo N, Peña MT, Costa D, Ríos J, Lacerda R, Leiva M. Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes. *Vet Ophthalmol.* 2015:1-6.
28. Eleftheriadis H, Cheong M, Sandeman S, et al. Corneal toxicity secondary to inadvertent use of benzalkonium chloride preserved viscoelastic material in cataract surgery. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(3):299-305.
29. McCartney AC, Kirkness CM. Comparison between posterior polymorphous dystrophy and congenital hereditary endothelial dystrophy of the cornea. *Eye.* 1988;2:63-70.
30. Berliner M. Technique of Biomicroscopy. In: *Biomicroscopy of the Eye.* New York: Hafner Publishing, Inc.; 1966:64-123.
31. Proulx S, Brunette I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):68-75.
32. Wong AC-M, Wong C-C, Yuen NS-Y, Hui S-P. Correlational study of central corneal thickness measurements on Hong Kong Chinese using

- optical coherence tomography, Orbscan and ultrasound pachymetry. *Eye*. 2002;16(6):715-721.
33. Bovelle R, Kaufman SC, Thompson HW, Hamano H. Corneal thickness measurements with the Topcon SP-2000P specular microscope and an ultrasound pachymeter. *Arch Ophthalmol*. 1999;117(7):868-870.
34. Cheung SW, Cho P. Endothelial cells analysis with the TOPCON specular microscope SP-2000P and IMAGEnet system. *Curr Eye Res*. 2000;21(4):788-798.
35. Sailstad DM, Peiffer RL. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Lab Anim*. 1981;15(4):393-395.
36. Fahim MM, Haji S, Koonapareddy C V, Fan VC, Asbell PA. Fluorophotometry as a diagnostic tool for the evaluation of dry eye disease. *BMC Ophthalmol*. 2006;6(20):1-7.
37. Carlson KH, Bourne WM, McLaren JW, Brubaker RF. Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. *Exp Eye Res*. 1988;47(1):27-41.
38. McNamara NA, Fusaro RE, Brand RJ, Polse KA, Srinivas SP. Measurement of corneal epithelial permeability to fluorescein. A repeatability study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(9):1830-1839.
39. Taylor MJ, Hunt CJ. Dual staining of corneal endothelium with trypan blue and alizarin red S: importance of pH for the dye-lake reaction. *Br J Ophthalmol*. 1981;65(12):815-819.
40. Park S, Fong AG, Cho H, et al. Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. *Cornea*. 2012;31(12):1476-1479.
41. Terry M, Ousley P. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. *Cornea*. 2001;20(3):239-243.
42. Price MO, Giebel AW, Fairchild KM, Price FW. Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective multicenter study of visual and refractive outcomes and endothelial survival. *Ophthalmology*.

- 2009;116(12):2361-2368.
43. Melles G. Posterior lamellar keratoplasty: DLEK to DSEK to DMEK. *Cornea*. 2006;25(8):879-881.
  44. McCauley, B M, Price MO, Fairchild KM, Price DA, Price FWJ. Prospective Study of Visual Outcomes and Endothelial Survival With Descemet Membrane Automated Endothelial Keratoplasty. *Cornea*. 2011;30(3):315-319.
  45. Dirisamer M, Parker J, Naveiras M, et al. Identifying causes for poor visual outcome after DSEK/DSAEK following secondary DMEK in the same eye. *Acta Ophthalmol*. 2012.
  46. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):4519-4526.
  47. Plummer CE, Ollivier F, Kallberg M, et al. The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: a review and series of 58 equine clinical cases (2002-2008). *Vet Ophthalmol*. 2009;12(Suppl. 1):17-24.
  48. Sumide T, Nishida K, Yamato M, Ide T. Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J*. 2006;20(2):392-394.
  49. Rama P, Matuska S. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010;363(2):148-155.
  50. Levin L, Ritch R. Stem cell therapy for ocular disorders. *Arch Ophthalmol*. 2004;122:621-627.
  51. Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(5):1626-1631.
  52. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest*

- Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(9):2992-2997.
53. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, et al. ROCK Inhibitor Converts Corneal Endothelial Cells into a Phenotype Capable of Regenerating In Vivo Endothelial Tissue. *Am J Pathol.* 2012;181(1):268-277.
  54. Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S. Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using animal models. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):60-67.
  55. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Method and measurement in pharmacology. In: *Rang & Dale's Pharmacology.* Elsevier; 2016:91-100.
  56. Werner L, Chew J, Mamalis N. Experimental evaluation of ophthalmic devices and solutions using rabbit models. *Vet Ophthalmol.* 2006;9(5):281-291.
  57. Song J-S, Heo J-H, Kim H-M. Protective Effects of Dispersive Viscoelastics on Corneal Endothelial Damage in a Toxic Anterior Segment Syndrome Animal Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(10):6164-6170.
  58. Matsubara M, Girard M, Kublin C. Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodelling cornea. *Dev Biol.* 1991;147:425-439.
  59. Kinoshita S, Okumura N, Koizumi N. Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using animal models. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):60-67.
  60. Maurice D, Perlman M. Permanent destruction of the corneal endothelium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16(7):646-649.
  61. Langham M. Observations on the growth of blood vessels into the cornea; application of a new experimental technique. *Br J Ophthalmol.*

- 1953;37(4):210-222.
62. Hull D, Green K. Hydrogen peroxide-mediated corneal endothelial damage. Induction by oxygen free radical. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25(11):1246-1253.
  63. Riley M, Giblin F. Toxic effects of hydrogen peroxide on corneal endothelium. *Curr Eye Res.* 1982;2(7):451-458.
  64. Nuyts R, Pels E, Greveya E. The effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on the corneal endothelium. *Curr Eye Res.* 1992;11:565-570.
  65. Roh DS, Funderburgh JL. Impact on the corneal endothelium of mitomycin C during photorefractive keratectomy. *J Refract Surg.* 2009;25(10):894-897.
  66. Schellini SA, Creppe MC, Gregório EA, Padovani CR. Lidocaine effects on corneal endothelial cell ultrastructure. *Vet Ophthalmol.* 2007;10(4):239-244.
  67. Kobayakawa S, Hiratsuka Y, Watabe Y, Murakami A, Tochikubo T. Comparison of the influence of intracameral gentamicin, gatifloxacin, and moxifloxacin on the corneal endothelium in a rabbit model. *Jpn J Ophthalmol.* 2010;54(5):481-485.
  68. Louati Y, Shaarawy T. Controversy: Is Benzalkonium Chloride Necessary in Antiglaucoma Drops? *J Curr Glaucoma Pract.* 2012;6(3):104-107.
  69. Green K, Hull DS, Vaughn ED, Malizia AA, Bowman K. Rabbit endothelial response to ophthalmic preservatives. *Arch Ophthalmol.* 1977;95(12):2218-2221.
  70. Ichijima H, Petroll WM, Jester J V, Cavanagh HD. Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea.* 1992;11(3):221-225.
  71. Baudouin C, de Lunardo C. Short-term comparative study of topical 2% carteolol with and without benzalkonium chloride in healthy volunteers. *Br J Ophthalmol.* 1998;82(1):39-42.

72. Xiong C, Chen D, Liu J, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(5):1850-1856.
73. Chen W, Li Z, Hu J, et al. Corneal alternations induced by topical application of benzalkonium chloride in rabbit. *PLoS One.* 2011;6(10):e26103.
74. Bagnis A, Papadia M, Scotto R, Traverso CE. Antiglaucoma drugs: The role of preservative-free formulations. *Saudi J Ophthalmol.* 2011;25(4):389-394.
75. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(4):312-334.
76. Labbé A, Pauly A, Liang H, et al. Comparison of toxicological profiles of benzalkonium chloride and polyquaternium-1: an experimental study. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2006;22(4):267-278.
77. Means TL, Holley GP, Mehta KR, Edelhauser HF. Corneal Edema from an Intraocular Irrigating Solution Containing Benzalkonium Chloride. *Cutan Ocul Toxicol.* 1994;13(1):67-81.
78. Kataria S. Corneal endothelial safety & toxicity with intraocular surgical agents. *J Bombay Ophthalmol Assoc.* 2004;13(2):33-36.
79. Chung S, Lee S, Cristol S, Lee E. Impact of short-term exposure of commercial eyedrops preserved with benzalkonium chloride on precorneal mucin. *Mol Vis.* 2006;12:415-421.
80. Liu H, Routley I, Teichmann KD. Toxic endothelial cell destruction from intraocular benzalkonium chloride. *J Cataract Refract Surg.* 2001;27(11):1746-1750.
81. Swan K. Reactivity of the ocular tissues to wetting agents. *Am J Ophthalmol.* 1944;27(10):1118-1122.
82. Pauly A, Brignole-Baudouin F, Labbé A, Liang H, Warnet J-M, Baudouin

- C. New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(12):5473-5483.
83. Liang H, Baudouin C, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Conjunctival and corneal reactions in rabbits following short-and repeated exposure to preservative-free tafluprost, commercially available latanoprost and 0.02% benzalkonium chloride. *Br J Ophthalmol.* 2008;92(9):1275-1282.
84. Liang H, Mao Z, Riancho L, et al. Reduction of quaternary ammonium-induced ocular surface toxicity by emulsions : an in vivo study in rabbits. *Mol Vis.* 2008;14:204-216.
85. Guenoun J-M, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet J-M, Brignole-Baudouin F. In Vitro Study of Inflammatory Potential and Toxicity Profile of Latanoprost, Travoprost, and Bimatoprost in Conjunctiva-Derived Epithelial Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2005;46(7):2444-2450.
86. Guenoun J, Baudouin C. In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of latanoprost, travoprost, and bimatoprost on conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(12):4594-4599.
87. Britton B, Hervey R, Kasten K, Gregg S, McDonald T. Intraocular irritation evaluation of benzalkonium chloride in rabbits. *Ophthalmic Surg.* 1976;7(3):46-55.
88. English R, Gilger BC. Ocular Immunology. In: *Kirk N. Gelatt Veterinary Ophthalmology*2. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2013:273-299.
89. Hendrix DVH. Diseases and Surgery of the Canine Anterior Uvea. In: *Kirk N. Gelatt Veterinary Ophthalmology.* Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2013:1146-1198.
90. Pauly A, Meloni M, Brignole-Baudouin F, Warnet J-M, Baudouin C. Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: early detection of toxic damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(4):1644-1652.

91. Dubielzig RR, Ketring KL, McLellan GJ, Albert DM. Pathologic mechanisms in ocular disease. In: *Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review*. New York: Saunders Elsevier; 2010:9-27.
92. Pellinen P, Huhtala A, Tolonen A. The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium in vitro and the distribution of. *Curr Eye Res*. 2012;37(2):145-154.
93. Hughes EH, Pretorius M, Eleftheriadis H, Liu CSC. Long-term recovery of the human corneal endothelium after toxic injury by benzalkonium chloride. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(11):1460-1463.