



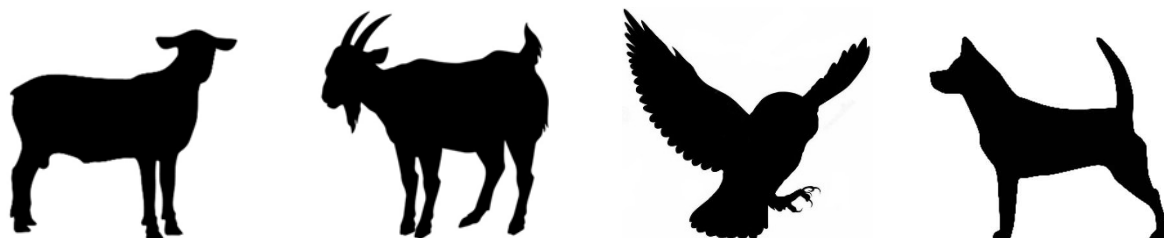
Universitat Autònoma de Barcelona

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

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



Estudio del endotelio corneal en diferentes especies animales

Natalia Coyo Asensio

Directoras:

Dra. Marta Leiva Repiso

Dra. Teresa Peña Giménez

Tutora:

Dra. Marta Leiva Repiso

UAB

Doctorat en Medicina i Sanitat Animals

Departament de Medicina i Cirurgia Animals – Facultat de Veterinària

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

2018

Programa de Doctorat en Medicina i Sanitat Animals
Departament de Medicina i Cirurgia Animals
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

ESTUDIO DEL ENDOTELIO CORNEAL EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES

Memoria presentada por:

Natalia Coyo Asensio

para optar al grado de

Doctor en Veterinaria

Bellaterra, 13 de julio de 2018

Directoras de tesis:

Dra. Marta Leiva Repiso y Dra. Maria Teresa Peña Giménez

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

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada “**Estudio del endotelio corneal en diferentes especies animales**”, la memoria de la cual es presentada por **Natalia Coyo Asensio** 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

Maria Teresa Peña Giménez

Bellaterra, 18 de mayo de 2018

A la meva família i, especialment, al meu avi Navidad.

“El peor enemigo del conocimiento no es la ignorancia, es la ilusión del conocimiento”.

Stephen Hawking.

Agradecimientos



Quería dar las gracias en primer lugar a mis directoras, las doctoras Marta Leiva y Teresa Peña, por todas las horas y el esfuerzo invertidos en la presente tesis, tanto en la realización de los estudios como en la posterior elaboración de los manuscritos, así como por aportar sus conocimientos y su experiencia. De forma personal, agradecerles el haber despertado mi interés en la oftalmología veterinaria gracias a haber sabido transmitir su inestimable pasión por este campo.

En segundo lugar, a los exresidentes del Servicio de Oftalmología Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona: Fernando Laguna, Rodrigo Lacerda y Martí Cairó, por toda su ayuda.

Al residente Daniel Costa, así como al inagotable Adán Peña, por todo su apoyo y su tiempo invertido desde el inicio de la tesis hasta su final (¡no me olvido de todas las horas en el laboratorio y de los interminables viajes a Barbastro a horas intempestivas!).

A los estudiantes de veterinaria e internos del Hospital Clínic Veterinari – UAB que han pasado por el servicio de Oftalmología y que, de forma desinteresada, se han prestado para echar una mano en el momento que ha hecho falta.

A mi amigo y compañero del departamento, Adrià Aguilar, que no solo no dudó en ayudarme sin nada a cambio incluso en fin de semana si no que además me ha estado apoyando y animando todos estos años. También a los veterinarios del HCV-UAB del servicio de cirugía y anestesia por su ayuda (y paciencia) en el estudio en la especie canina.

A los veterinarios oficiales y empleados de los mataderos de Sant Cugat, Barbastro y el Ripollès por facilitar la obtención de muestras y la documentación de los individuos. También gracias a Pepe del Servicio de Granjas Experimentales de la UAB, por estar siempre a disposición del servicio.

A los veterinarios de los centros de recuperación, Rafael Molina y Olga Nicolás porque les faltó tiempo para apuntarse, sin dudarlo, al estudio en el cábrabo común y aportar todos sus conocimientos en esta especie.

A mis amigos y amigas porque de tanto oírme hablar de la tesis, ya deben saber sobre el tema casi más que yo. Muchas gracias por vuestro apoyo.

Y finalmente, pero no por ello menos importante, a mis padres, mi hermana, mis tíos y mi abuela, por todo su cariño y apoyo incondicional cada uno de los días que ha durado esta aventura.

Muchas gracias a todos/as, sin vuestra ayuda, esta tesis no hubiese sido posible.

Índice

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	7
1. ANATOMÍA Y FUNCIONES DE LA CÓRNEA	9
2. EL ENDOTELIO CORNEAL	12
2.1. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA	12
2.2. FACTORES FISIOLÓGICOS QUE AFECTAN AL ENDOTELIO Y AL GROSOR CORNEAL	14
2.2.1. ENVEJECIMIENTO	14
2.2.2. POBLACIÓN O RAZA	16
2.3. RESPUESTA ENDOTELIAL AL DAÑO	16
2.4. MÉTODOS DE VISUALIZACIÓN DEL ENDOTELIO CORNEAL	18
2.4.1. MÉTODOS <i>EX VIVO</i>	18
2.4.2. MÉTODOS <i>IN VIVO</i>	20
3. ENDOTELIOPATÍAS	27
3.1. ENDOTELIOPATÍAS PRIMARIAS	27
3.1.1. DISTROFIA DE FUCHS / DISTROFIA ENDOTELIAL CORNEAL	27
3.1.2. DISTROFIA POLIMÓRFICA POSTERIOR	29
3.1.3. DEGENERACIÓN ENDOTELIAL SENIL	32
3.2. ENDOTELIOPATÍAS SECUNDARIAS	33
3.2.1. PROCESOS INTRAOCULARES	33
3.2.2. CAUSAS SISTÉMICAS	34
HIPÓTESIS	37
HIPÓTESIS EN LA ESPECIE OVINA	39
HIPÓTESIS EN LA ESPECIE CAPRINA	39
HIPÓTESIS EN EL CÁRABO COMÚN (<i>STRIX ALUCO</i>)	39
HIPÓTESIS EN LA ESPECIE CANINA	39
OBJETIVOS	41
OBJETIVOS EN LA ESPECIE OVINA	43
OBJETIVOS EN LA ESPECIE CAPRINA	43
OBJETIVOS EN EL CÁRABO COMÚN (<i>STRIX ALUCO</i>)	43
OBJETIVOS EN LA ESPECIE CANINA	43
ESTUDIO 1	45

ESTUDIO 2	53
ESTUDIO 3	77
ESTUDIO 4	85
DISCUSIÓN	107
1. GROSOR CORNEAL	109
2. DENSIDAD CELULAR ENDOTELIAL	110
3. ÁREA MEDIA CELULAR	111
4. PLEOMORFISMO	112
5. POLIMEGATISMO	112
6. VARIACIONES DE GC Y DCE EN FUNCIÓN DEL CUADRANTE CORNEAL	113
7. VARIACIONES DE GC Y DCE EN FUNCIÓN DE LA RAZA EN OVINO	114
8. VARIACIONES DE GC Y PARÁMETROS ENDOTELIALES EN FUNCIÓN DE LA EDAD	115
9. VARIACIONES DE GC Y PARÁMETROS ENDOTELIALES EN FUNCIÓN DEL ÍNDICE CEFÁLICO EN LA ESPECIE CANINA	117
LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS	120
CONCLUSIONES	123
CONCLUSIONES EN LA ESPECIE OVINA	125
CONCLUSIONES EN LA ESPECIE CAPRINA	126
CONCLUSIONES EN EL CÁRABO COMÚN	127
CONCLUSIONES EN LA ESPECIE CANINA	127
ANEXO	129
BIBLIOGRAFÍA	141

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACAID: del inglés, *anterior chamber-associated immune deviation*.

AMC: área media celular (*en inglés: MCA, mean cell area*).

ANOVA: del inglés, *analysis of variance*.

BSS: solución salina balanceada (*del inglés balanced salt solution*).

CAV: adenovirus canino (*del inglés, canine adenovirus*)

CV: coeficiente de variación.

DCE: densidad celular endotelial (*en inglés: ECD, endothelial cell density*).

DES: degeneración endotelial senil.

DPP: distrofia polimórfica posterior.

GC: grosor corneal (*en inglés: CT, corneal thickness*).

GCC: grosor corneal central (*en inglés: CCT, central corneal thickness*)

IC: índice cefálico (*en inglés: SI, skull index*)

IQR: del inglés, *interquartile range*

LSCM: del inglés, *laser scanning confocal microscope*.

LSD: del inglés, *least significant difference*.

OD: ojo derecho

OS: ojo izquierdo

SEM: microscopio electrónico de barrido (*del inglés scanning electron microscope*).

SSCM: del inglés, *slit-scanning confocal microscope*.

TEM: microscopio electrónico de transmisión (*del inglés transmission electron microscope*).

TSCM: del inglés, *tandem scanning confocal microscope*.

Introducción

1. ANATOMÍA Y FUNCIONES DE LA CÓRNEA

La córnea es una estructura **transparente, avascular y lisa**, situada en la parte más anterior del globo ocular que, junto a la esclera, conforma la túnica fibrosa.

Su forma es generalmente elíptica, siendo el diámetro horizontal mayor que el vertical. La diferencia entre ambos diámetros varía en función de la especie; siendo menor en el perro y el gato; y más pronunciada en ungulados, incrementando el campo de visión de forma significativa en éstos últimos. ⁽¹⁾

En la mayoría de especies animales, la córnea está formada por cuatro capas histológica y anatómicamente diferenciadas que, de exterior a interior, son: el **epitelio**, el **estroma**, la **membrana de Descemet** y el **endotelio** (Fig.1). Además, en el hombre y algunas especies animales (primates, algunas aves, algunos peces, cetáceos, ciervos y jirafas) puede observarse una quinta capa corneal, situada entre el epitelio y el estroma. Esta capa, denominada **membrana de Bowman**, es la membrana basal del epitelio corneal. ⁽²⁾ En humanos, se ha descrito recientemente también una sexta capa corneal, situada entre el estroma y la membrana de Descemet, conocida como la **capa de Dua**. ⁽³⁾

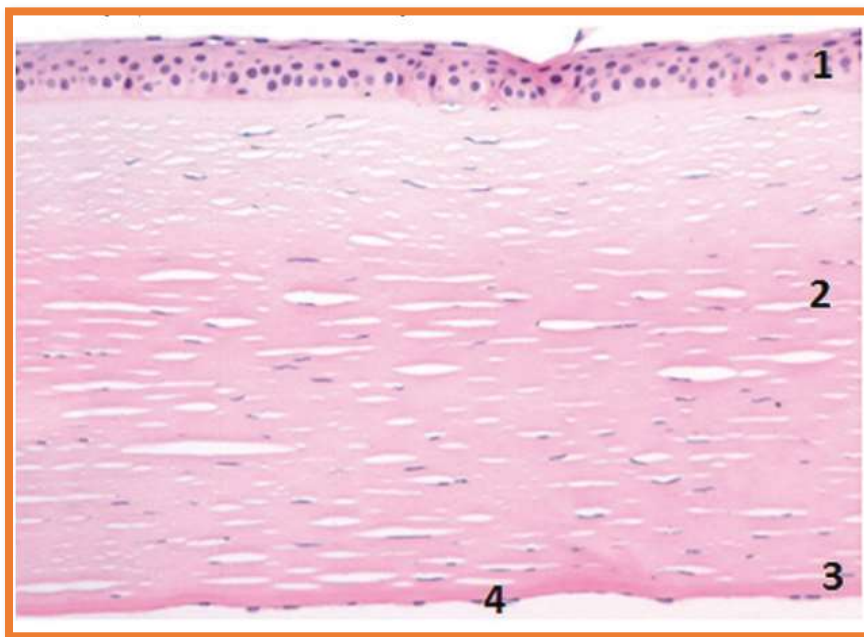


Figura 1. Imagen histológica de la córnea de un perro. Véanse las diferentes capas corneales: 1. Epitelio; 2. Estroma; 3. Membrana de Descemet y; 4. Endotelio.

El **epitelio corneal** es una capa escamosa, estratificada y no queratinizada, que recubre la superficie anterior de la córnea. El **estrato más interno** del epitelio está formado por células basales epiteliales que se anclan a la membrana basal del epitelio mediante hemidesmosomas, y que, a medida que se dividen, fuerzan a las células más antiguas a aplanarse y desplazarse hacia estratos más superficiales, convirtiéndose en células poliédricas (también conocidas como “células aladas”), que conforman el **estrato intermedio** del epitelio. En el **estrato más externo** se encuentran las células escamosas, que presentan microvellosidades encargadas de fijar estratégicamente la capa mucosa de la película lagrimal. ⁽⁴⁾

La **membrana de Bowman** se describió por primera vez en humanos en 1947 ⁽⁵⁾ como una lámina transparente, elástica, homogénea y continua, sin estructura interna aparente. En 1952 se describió también en macacos ⁽⁶⁾ considerándose, durante muchos años, exclusiva de los primates. No obstante, décadas más tarde, también se identificó en renos, ciervos y en ciertas especies de peces. ⁽⁷⁻⁹⁾ Más recientemente, se ha descrito en jirafas, ⁽²⁾ diferentes cetáceos ⁽¹⁰⁾ y aves. ⁽¹¹⁾ La membrana de Bowman es una estructura acelular compuesta por diferentes tipos de colágeno estructural (I, III, V y VI) y cuyo grosor varía entre 10 y 15 μm . ⁽¹²⁾ Además, se ha demostrado que esta capa no tiene características elásticas, siendo bastante resistente y respondiendo con tejido cicatricial ante cualquier lesión corneal. La función aparente de la membrana de Bowman es la adición de fuerza biomecánica y rigidez a la córnea, siendo responsable del mantenimiento de su forma en la parte más anterior. ⁽¹⁾

El **estroma corneal** supone el 90% del grosor corneal total y está compuesto mayoritariamente por **fibras de colágeno** y **queratocitos**. Las fibras de colágeno, cuya longitud es igual al diámetro corneal, están formadas por **fibrillas estriadas**, compuestas principalmente por colágeno tipo I. A su vez, también contienen, aunque en menor medida, colágeno de tipo III, V y XII. A pesar de no conocerse con exactitud la función que desempeña cada uno de estos tipos de colágeno, ⁽¹⁾ el tipo V se ha asociado al mantenimiento uniforme del diámetro fibrilar. ⁽¹³⁾ Los queratocitos se encuentran distribuidos entre las fibrillas, manteniendo su localización gracias, en parte, a la matriz extracelular, formada principalmente por colágeno tipo VI. Las fibras se disponen de forma paralela

entre sí, agrupándose en **lamelas**, que adquieren una disposición ortogonal, variando su dirección con respecto a la de las lamelas anterior y posterior. Sin lugar a dudas, la disposición de las fibras de colágeno estromal es un factor determinante para la transparencia corneal. ^(1,14)

En 2013 se describe una nueva capa en la córnea humana, la **capa de Dua**, que recibe el nombre de su principal descubridor. Esta capa se define como una estructura acelular ubicada entre el estroma y la membrana de Descemet, cuyas funciones, aunque no del todo establecidas, podrían tener un impacto considerable en la cirugía corneal avanzada, así como en el conocimiento de la biomecánica corneal y de ciertas enfermedades corneales estromales posteriores o profundas. ⁽³⁾

La **membrana de Descemet** es la membrana basal del endotelio corneal. Ésta capa acelular se produce de forma continuada a lo largo de la vida del animal, aumentando su grosor con la edad. Se considera una estructura relativamente elástica, formada por fibras de colágeno (III, IV, V y VI) y elastina. ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ El **endotelio corneal** es la capa más profunda de la córnea, situada entre la membrana de Descemet y el humor acuoso. Se trata de una monocapa de células, mayoritariamente de forma hexagonal, que controlan el paso de humor acuoso y nutrientes desde la cámara anterior al estroma corneal.

El **grosor corneal** varía en función de factores tales como especie, raza, individuo y edad, entre otros, considerándose valores inferiores a 1 mm (entre 0.5 y 0.8 mm) como fisiológicos. ^(14,18-22) En algunas especies animales se han descrito **diferencias de grosor entre la periferia y el centro** (heterogeneidad). Mientras que en el perro el grosor corneal central oscila entre 0.45-0.55 mm y el periférico entre 0.50-0.65 mm, en el gato, por el contrario, el grosor corneal central se ha descrito como 0.8-1 mm y el periférico como 0.4-0.6 mm. ⁽¹⁾

Dado que en pequeños animales la córnea fisiológica no presenta vascularización, **su nutrición depende íntegramente de la película lagrimal y el humor acuoso** (situado en las cámaras anterior y posterior del globo ocular), por lo que alteraciones en alguno de estos dos medios pueden conllevar enfermedades corneales de diferente gravedad. Así mismo, los párpados y la

membrana nictitante ejercen también un importante papel en la protección corneal. ⁽¹⁾

Entre las **funciones principales de la córnea** cabe destacar: proporcionar soporte a las estructuras intraoculares, y refractar/trasmitir la luz (gracias a su curvatura y transparencia, respectivamente). De hecho, la córnea se considera la estructura con mayor poder dióptrico del ojo (en el perro la córnea posee entre 40 y 42 dioptrías). ⁽¹⁾

La **transparencia** corneal, fundamental para su funcionamiento, depende de ciertas características, tales como: relativa baja celularidad, estado de deshidratación parcial, disposición regular de las fibras de colágeno estromal y ausencia de vasos, pigmento y queratina. Cualquier factor que altere estas características se traducirá en disminución de la transparencia corneal. ⁽¹⁴⁾

2. EL ENDOTELIO CORNEAL

2.1. Morfología y fisiología

El endotelio corneal es una **monocapa** situada en la superficie posterior de la córnea, en contacto directo con el humor acuoso, que está formada principalmente por células poligonales, aunque la mayoría presentan forma hexagonal. ⁽²³⁾ En la mayoría de especies animales, estas células **no presentan mecanismos de mitosis**. ⁽²⁴⁾ Sin embargo, se ha descrito cierta actividad mitótica en perros y gatos muy jóvenes. ⁽²⁵⁾

La morfología endotelial se ha descrito detalladamente en personas, en las que se ha establecido que la célula endotelial estándar mide aproximadamente 5 μm de altura y 18-20 μm de anchura, y presenta un núcleo alrededor de 7 μm de diámetro horizontal. La distancia entre células es de 30 μm , aunque puede reducirse hasta los 3 μm en zonas de uniones comunicantes (*gap junctions*) (Fig. 2). En la parte más apical de las células se encuentran, siguiendo una distribución focal y discontinua, las uniones estrechas (*tight junctions*, también conocidas como *zonula occludens*). La superficie posterior de la célula presenta microvellosidades, que están en contacto directo con el humor acuoso. ^(26,27)

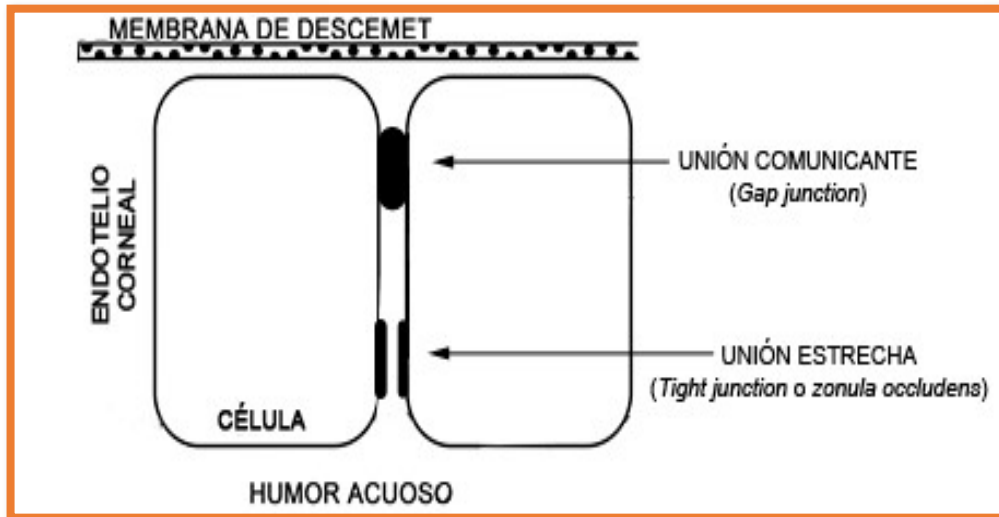


Figura 2. Localización de las uniones comunicantes (*gap junctions*) y uniones estrechas (*tight junctions*) entre las células endoteliales. Ambas uniones actúan como barrera física en el control del paso de nutrientes y humor acuoso hacia el estroma.

Al ser la córnea una estructura avascular y estar situada entre dos medios acuosos (película lagrimal y humor acuoso), debe contar con una serie de mecanismos que aseguren su nutrición y transparencia. Estos mecanismos se centran principalmente en el endotelio y epitelio corneal, actuando ambos como **barreras físicas y vehiculando la entrada de nutrientes**. En el caso concreto del endotelio corneal, la nutrición estromal está asegurada por las uniones intercelulares discontinuas (*zonula occludens incompleta* o *tight junctions*) del endotelio, que permiten el movimiento fluido de nutrientes acompañado, inevitablemente, de la entrada de cierta cantidad de humor acuoso (Fig. 2).⁽²⁸⁾ Dado que para el mantenimiento de la transparencia corneal es necesario un estado de deshidratación parcial, el humor acuoso entrante debe retornarse hacia la cámara anterior. Para ello, el endotelio posee un mecanismo activo: **una potente bomba sodio-potasio ATPasa**. A pesar de que numerosos estudios describen el funcionamiento de esta bomba, no se conoce con exactitud la relación de iones que intervienen en el proceso, aunque sí se ha establecido que es necesario bicarbonato, cloro y la enzima anhidrasa carbónica para su buen funcionamiento. El modelo de secreción aniónico (bicarbonato y cloro) es, a día de hoy, el más aceptado (Fig.3).⁽²⁹⁾

El endotelio es determinante en el mantenimiento de la deshidratación corneal, observándose un 500% de aumento de grosor corneal tras 24 horas de la eliminación del endotelio corneal. En contraste, la eliminación del epitelio corneal comporta un aumento menor del grosor corneal (200%).⁽³⁰⁾

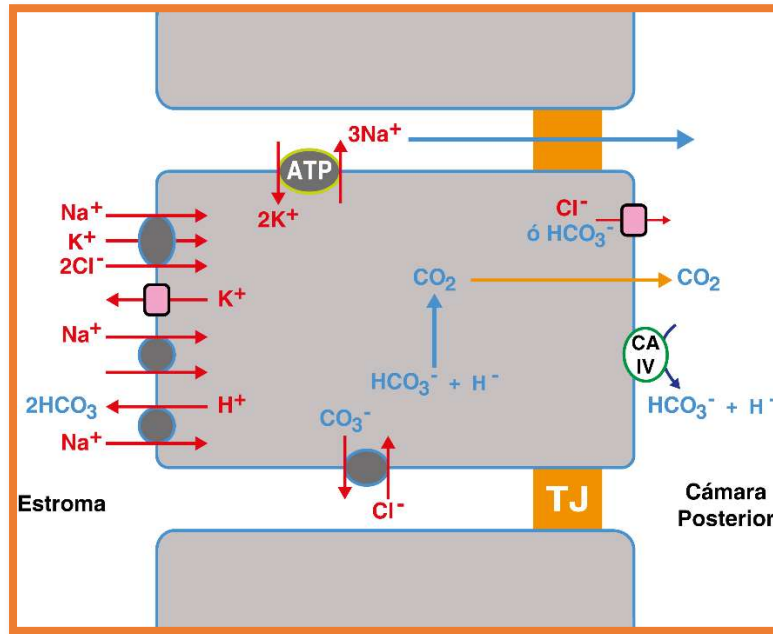


Figura 3. Modelo de secreción aniónica de la bomba endotelial: el movimiento de las cargas negativas generadas por los aniones (Cl^- y HCO_3^-) crea una pequeña diferencia de potencial (0,5 mV) que atrae Na^+ a través de las uniones estrechas del endotelio. El flujo de NaHCO_3^- y/o NaCl genera la fuerza osmótica para el movimiento de agua. Las altas concentraciones de Cl^- y HCO_3^- intracelulares junto con el potencial negativo de membrana permiten el paso de aniones a través de canales selectivos, en la membrana apical de la célula. Una ruta adicional para el flujo de HCO_3^- es debida a la conversión del HCO_3^- intracelular a CO_2 , mediada por la anhidrasa carbónica de tipo 2, así como la conversión de CO_2 a HCO_3^- en la superficie apical, facilitada por la anhidrasa carbónica de tipo 4. (Modificado de: J.A. Bonanno. Molecular Mechanisms Underlying the Corneal Endothelial Pump. *Experimental Eye Research* 2012; 95(1):2-7).

2.2. Factores fisiológicos que afectan al endotelio y al grosor corneal

2.2.1. Envejecimiento

El endotelio corneal de un bebé tiene aproximadamente 500000 células endoteliales y una densidad celular endotelial (DCE) de 7500 células/ mm^2 .⁽²³⁾ Esta densidad se reduce durante toda la vida, siendo la reducción rápida durante el primer año, y más gradual en los posteriores. La rápida reducción inicial de la DCE está relacionada con el aumento del diámetro corneal durante este período.^(31,32) En humanos, se ha establecido que entre los 2 y los 98 años de edad, la reducción en la densidad endotelial es del 0.56% por año.⁽³³⁾

A pesar de que el efecto de la edad sobre la DCE se ha descrito ampliamente en humanos, en veterinaria son escasos los estudios con un número significativo de animales. La disminución de la DCE a lo largo de la vida se ha descrito en gatos, (22) perros, (18) llamas y alpacas (34) y caballos. (35)

A pesar de las evidentes diferencias entre las especies descritas anteriormente, la DCE en mamíferos es relativamente constante, situándose alrededor de las 2500 células/mm² en el animal adulto. (31)

Debido a que el endotelio corneal no presenta capacidad de regeneración en la mayoría de especies, la disminución en la DCE suele ir acompañada de aumento del área media de las células endoteliales para garantizar el recubrimiento de toda la superficie corneal posterior. (36,37) El aumento del área media celular (AMC) con la edad se ha descrito también en diferentes especies animales tales como el perro (18) y el gato, (22) traduciéndose irremediamente en la pérdida de su forma hexagonal, lo que también se conoce como aumento del pleomorfismo endotelial. (18,22,38) En el humano adulto, el porcentaje de células endoteliales hexagonales suele situarse por encima del 60%. (39)

Algunos estudios, tanto en humanos como en animales, apuntan a que las diferencias de tamaño entre células endoteliales aumentan con la edad, o, en otras palabras, aumenta el polimegatismo. (40,41) Sin embargo, hay cierta controversia en cuanto a los resultados, dado que algunos estudios no han podido demostrar relación alguna entre edad y polimegatismo, sugiriendo que este último es más bien un indicador de daño endotelial. (18,22,42) Este parámetro se expresa como un coeficiente de variación (CV) y por lo tanto carece de unidades. En el humano adulto-joven los valores de CV fisiológicos se sitúan entre 22 y 31, con una media de 27. (43)

Finalmente, en oftalmología veterinaria, se ha descrito aumento del grosor corneal (GC) asociado a la edad en perros, (18,31,44) gatos, (22,31) vacas, (31) cerdos, (31) conejos, (24,31,45) y caballos. (46) A pesar de que la mayoría de los estudios realizados en animales coinciden con el aumento del GC con la edad, en oftalmología humana los resultados son dispares, habiendo numerosos estudios que apuntan a su reducción. (42,47,48) Por un lado, el aumento del GC con la edad podría deberse, al menos en parte, al engrosamiento progresivo de la membrana

de Descemet o al leve edema corneal difuso secundario a la reducción de la DCE. ⁽²³⁾ Por otro lado, la disminución del GC con la edad se explicaría por la reducción en el número de queratocitos y/o por la disminución en el número de fibras de colágeno. ⁽⁴⁹⁾

2.2.2 Población o raza

En oftalmología humana, son cuantiosos los estudios publicados que muestran diferencias en el GC en función de la población estudiada, incluso se han descrito diferencias entre subpoblaciones, por ejemplo, la asiática; dónde se describen córneas más gruesas en la población china y filipina comparándolas con la población japonesa. ⁽⁵⁰⁾ Del mismo modo, también se han publicado multitud de estudios relacionados con la DCE, mostrando claras diferencias entre la población caucásica, la iraní, la india y la china. ⁽⁴⁷⁾

En oftalmología veterinaria, en cambio, las descripciones de diferencias en los parámetros endoteliales y el GC en función de la raza son prácticamente inexistentes y en la mayoría de publicaciones, el estudio de dichas diferencias no está entre los objetivos principales.

2.3. Respuesta endotelial al daño

Tal y como se ha descrito anteriormente, el endotelio corneal de la mayoría de especies animales no presenta capacidad de regeneración en edad adulta. Por lo tanto, ante una lesión localizada del endotelio corneal, las células afectadas descaman hacia la cámara anterior y las células colindantes al defecto se alargan y adelgazan para cubrirlo. Estas células alrededor de la lesión rompen sus uniones intercelulares y desarrollan pseudópodos, permitiendo su migración para cubrir el defecto (0.5 a 1 mm por día). ⁽²³⁾ Paralelamente, también se aumenta la densidad y la función de las bombas endoteliales. ⁽⁵¹⁾ Como resultado de esta reparación se **reduce la DCE, aumenta el AMC** y cambia la morfología celular (aumentando el **pleomorfismo** y el **polimegatismo**). No obstante, el endotelio reparado sigue siendo capaz de mantener su función. ⁽²³⁾

Si por el contrario se produce una lesión grave en el endotelio, que comporta la reducción de la DCE por debajo de las 500 – 800 células/mm² (10-15% de los valores de normalidad de DCE), los mecanismos de reparación descritos

anteriormente no son viables, debido a la poca cantidad de células endoteliales restantes (Fig.4). Al alcanzar estos límites críticos, el endotelio es incapaz de ejercer correctamente su función, produciéndose descompensación corneal y apareciendo edema difuso marcado. ⁽²³⁾

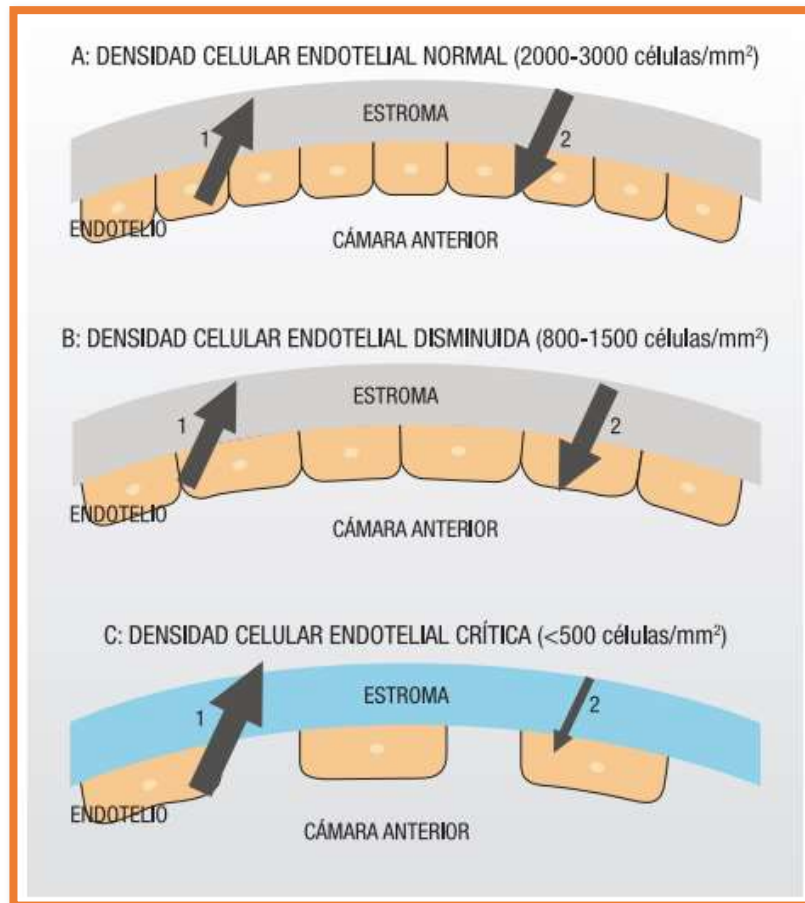


Figura 4. (A) Densidad celular endotelial adecuada: el humor acuoso (1), que entra a través de las uniones celulares, es enviado hacia la cámara anterior (2) mediante la bomba endotelial. (B) Si disminuye la densidad endotelial, las células restantes aumentan su tamaño, modifican su forma y se generan más bombas endoteliales. En estos casos, la entrada de humor acuoso al estroma sigue siendo igual a su devolución hacia la cámara anterior. (C) Densidad celular endotelial crítica (<500 células/mm²): el endotelio no puede ejercer su función, entrando grandes cantidades de humor acuoso al estroma desde el que no puede evacuarse, produciendo edema estromal. (Fuente: N. Coyo, M. Leiva, T. Peña. *El endotelio corneal y sus principales enfermedades en el perro. Clínica Veterinaria de Pequeños Animales* 2017; 37(3):171-180)

2.4. Métodos de visualización del endotelio corneal

2.4.1. Métodos *ex vivo*

2.4.1.1. Tinciones vitales

A pesar de que se han descrito diferentes protocolos de tinciones vitales para la evaluación de la viabilidad del endotelio corneal en bancos de córneas, ⁽⁵²⁾ uno de los más utilizados es la tinción combinada de **rojo alizarina y azul tripán**. Este último permite la identificación de las células endoteliales muertas o severamente dañadas, mientras que el rojo alizarina permite la visualización de los bordes celulares y las áreas expuestas de la membrana de Descemet. ⁽⁵³⁾

Empero la publicación de diferentes protocolos y estudios con diferentes concentraciones de estas dos tinciones, ^(52,54,55) un estudio con resultados reproducibles, sugiere recubrir el endotelio con gotas de azul tripán al 0.25% durante 90 segundos, posteriormente lavar con solución salina balanceada (BSS), para después sumergir el tejido en rojo alizarina al 0.2% durante 90 segundos, y finalmente realizar otro lavado con BSS (Fig.5). ⁽⁵⁴⁾

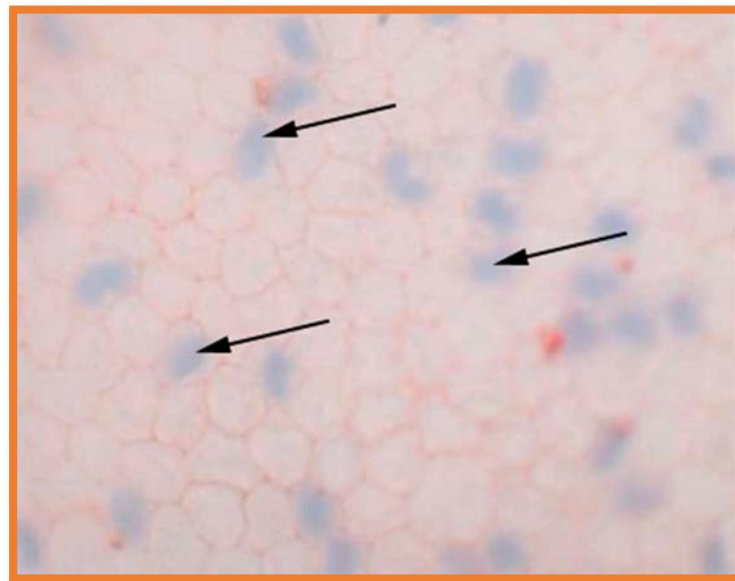


Figura 5. Endotelio corneal dañado de un conejo teñido mediante el protocolo de Taylor con azul tripán al 0.25% y rojo alizarina al 0.2%. Las flechas marcan células teñidas con azul tripán. (Fuente: S. Segarra, M. Leiva, D. Costa *et al.* A dose-escalation *ex vivo* study on the effects of intracameral benzalkonium chloride in rabbits. *BMC Veterinary Research* 2018;14(1):39)

2.4.1.2. Microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido

El desarrollo de los primeros microscopios electrónicos se realizó en los años 20, sin embargo, no fue hasta 1930 que se diseñó el primer microscopio electrónico funcional. ⁽⁵⁶⁾ Éstos, a diferencia de la microscopía óptica que emplea luz visible como fuente de iluminación y lentes ópticas para conseguir la magnificación de la estructura observada, usan un haz de electrones y magnifican la imagen mediante lentes electromagnéticas dentro de un sistema de vacío.

Los dos principales tipos de microscopios electrónicos disponibles en la actualidad son el **microscopio electrónico de transmisión** (TEM) y el de **barrido** (SEM). Mientras que el primero proyecta electrones a través de una fina porción de tejido y origina una imagen bidimensional (es decir, los electrones atraviesan la muestra), el segundo “barre” la superficie de la muestra, generando la imagen con electrones secundarios que ofrecen una imagen tridimensional. A grandes rasgos, el SEM ofrece imágenes en detalle de la superficie de la estructura, mientras que el TEM permite visualizar detalles de la estructura interna de la muestra.

En veterinaria, la microscopía electrónica se ha utilizado en numerosos estudios del endotelio corneal. Mediante SEM, se han descrito las características anatómicas del endotelio corneal en el avestruz, ⁽⁵⁷⁾ en el pingüino de Magallanes ⁽⁵⁸⁾ y en el cerdo, ⁽⁵⁷⁾ entre otros (Fig. 6). Así mismo, numerosos estudios han utilizado TEM para evaluar el efecto de algunos tóxicos o enfermedades sobre las células endoteliales corneales. ^(59,60)

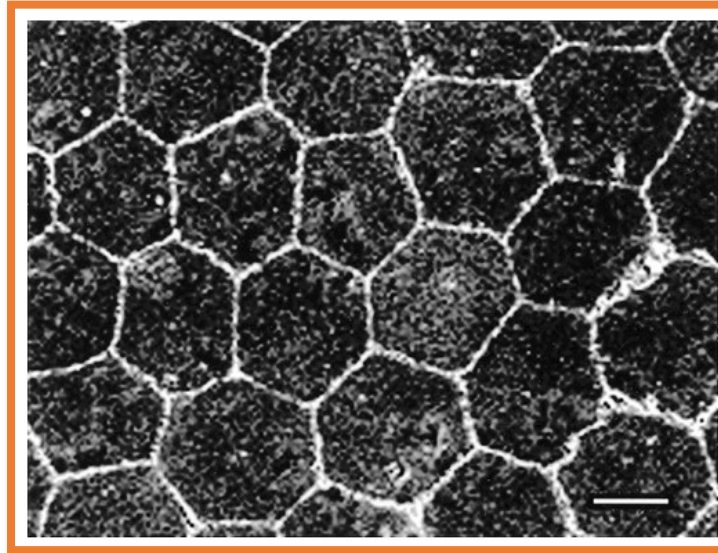


Figura 6. Microfotografía del endotelio corneal periférico de un pingüino de Magallanes obtenida mediante SEM. (Fuente: J.A.T. Pigatto, J.L. Laus, Santos J.M, *et al.* Corneal Endothelium of the Magellanic Penguin (*Sphenicus Magellanicus*) by Scanning Electron Microscopy. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2005; 36(4): 702-705).

2.4.2. Métodos *in vivo*

2.4.2.1. Biomicroscopía

En 1919, Alfred Vogt describió por primera vez la apariencia del endotelio corneal sano y patológico mediante biomicroscopía. ⁽⁶¹⁾ El examen con **lámpara de hendidura o biomicroscopio**, permite realizar una primera aproximación diagnóstica en caso de sospecha de enfermedad endotelial, aunque la información que ofrece esta prueba es limitada y requiere de cierta experiencia para poder visualizar el endotelio correctamente.

Algunas alteraciones del endotelio corneal, tales como la Distrofia de Fuchs', pueden evidenciarse gracias al **reflejo especular** producido mediante **iluminación directa con hendidura ancha** (0.8 mm) (paralelepípedo). El endotelio puede visualizarse mediante este reflejo, que se produce cuando el ángulo de incidencia de la luz en la córnea es igual al ángulo de reflexión (que a la vez debe ser el mismo que el de observación). Para obtener este reflejo, la fuente de luz de la lámpara de hendidura debe situarse aproximadamente 30° hacia un lado de la córnea y el microscopio 30° hacia el otro (Fig. 7). Son necesarias magnificaciones elevadas para poder observar correctamente el endotelio corneal, por lo tanto, es recomendable el empleo de una lámpara de hendidura fija o una portátil de gran calidad. ⁽⁶²⁾

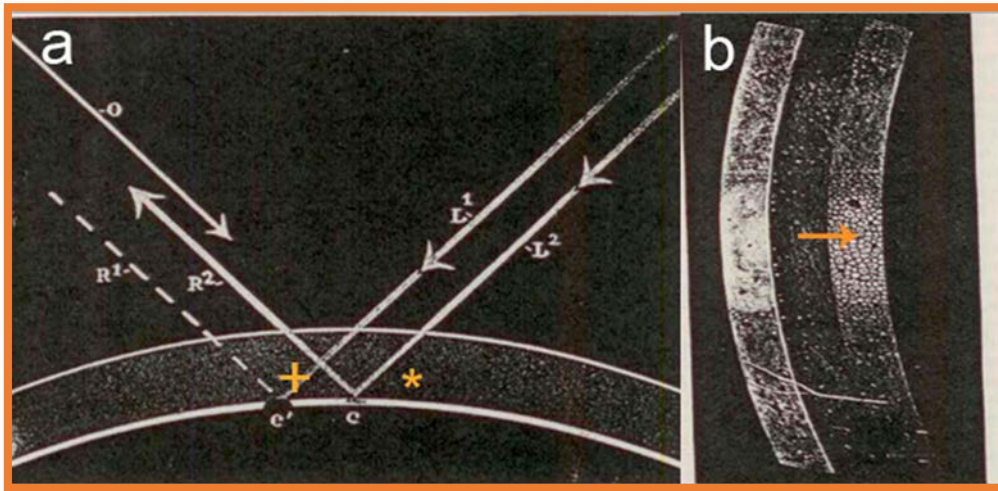


Figura 7. a) El reflejo especular mediante lámpara de hendidura se produce cuándo el ángulo de incidencia de la luz (*) es igual al de observación (+). b) Mediante el reflejo especular podemos observar el endotelio corneal (flecha). (Fuente: Berliner ML. *Biomicroscopy of the eye: Slit lamp microscopy of the living eye*. New York: Hafner Publishing; 1966).

El endotelio corneal también puede visualizarse por **iluminación indirecta**. En esta técnica, no se dirige el haz de luz directamente sobre la estructura en estudio, si no que se aprovecha la transmisión de la luz a través de los tejidos. La **retroiluminación** es la técnica de iluminación indirecta más empleada, pudiéndose observar estructuras tales como el endotelio y la membrana de Descemet, gracias a la reflexión de la luz en la retina o en el iris (Fig. 8).⁽⁶³⁾

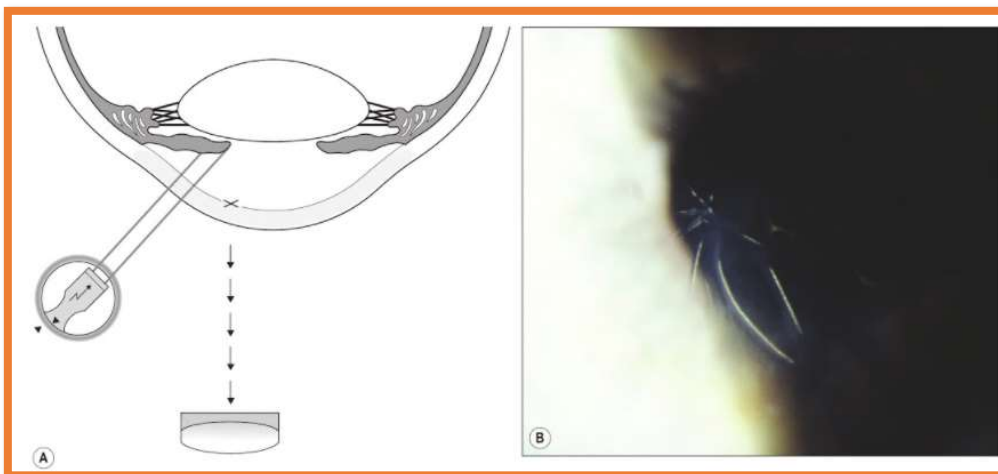


Figura 8. a) Imagen esquemática de la técnica de retroiluminación desde el iris para la visualización de la membrana de Descemet. b) Imagen de diversos pliegues en la membrana de Descemet observados gracias a la retroiluminación desde el iris. (Fuente: C.L. Mártonyi. *Slit Lamp Examination and Photography*. En: *Cornea: fundamentals, diagnosis and management*, 3rd edition. Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri 2010: 89-118).

2.4.2.2. **Microscopía especular**

A pesar de que las primeras descripciones del uso del reflejo especular para la visualización del endotelio corneal mediante lámpara de hendidura datan del 1919, no es hasta 1968 que David M. Maurice, oftalmólogo británico, desarrolla el primer microscopio especular con una magnificación de 400x. ⁽⁶⁴⁾ Sin embargo, este microscopio “de laboratorio” solo permitía la visualización del endotelio corneal *ex vivo*. A mediados de los 70s, se publican los primeros artículos acerca de la visualización del endotelio corneal mediante el empleo del microscopio especular *in vivo*. ^(65,66) En estos estudios, se pone de manifiesto que el **microscopio especular** permite visualizar el endotelio corneal de forma no invasiva, mediante el uso del reflejo especular. En esta técnica, las células endoteliales se observan gracias a que su índice refractivo es superior al del humor acuoso y, por lo tanto, se obtiene un reflejo del 0,022% de la luz proyectada con el microscopio hacia el interior del globo ocular. ⁽⁶⁷⁾

El microscopio especular permite, pues, el examen cuantitativo y cualitativo del endotelio corneal, proporcionando valores tales como DCE, AMC y polimegatismo. Asimismo, algunos microscopios también proporcionan los valores de pleomorfismo. Esta técnica de microscopía permite detectar numerosas anomalías endoteliales derivadas de enfermedades o traumatismos. Así mismo, el estudio mediante microscopía especular resulta muy útil en el desarrollo de técnicas médicas y quirúrgicas que permitan minimizar el daño a las células endoteliales.

Actualmente hay 2 tipos básicos de microscopio especular: **el de contacto y el de no contacto**. En el **microscopio especular de contacto** la lente del aparato se sitúa en contacto directo con la superficie corneal, previo uso de anestésico tópico, lo que permite la eliminación del reflejo especular del epitelio. Por el contrario, la **microscopía especular de no contacto** emplea tecnología de enfoque automática para encontrar el reflejo especular (Fig. 9).

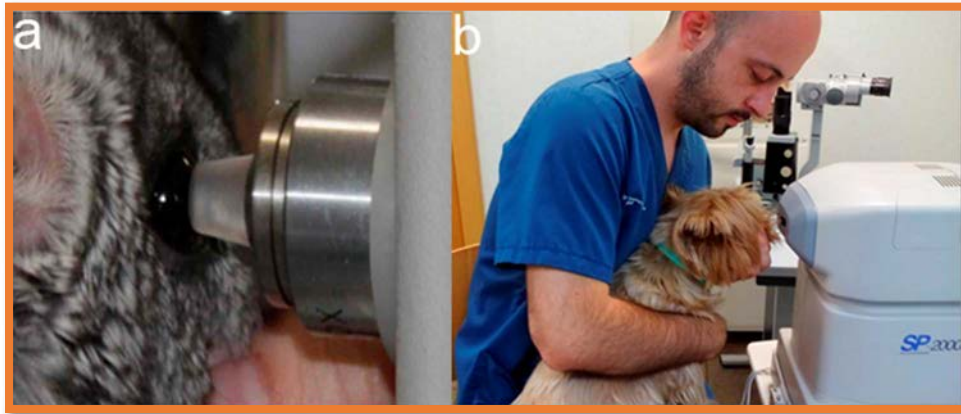


Figura 9. a) Microscopía especular de contacto realizada en una chinchilla (Fuente: B.S. Bercht, L. Albuquerque, A.C. Araujo. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Veterinary Ophthalmology* 2015; 18 Suppl 1: 137-142) y b) Microscopía especular de no contacto en un perro.

El campo de visión obtenido es mucho mayor en el microscopio de contacto que en el de no contacto, lo que permite una valoración más objetiva y rápida (Fig.10).⁽⁶⁸⁾ Además, el microscopio de contacto es más fácil de usar y proporciona mejor magnificación y resolución. Sin embargo, el contacto de la lente y la manipulación de la córnea puede producir molestias en el paciente, así como artefactos, problema que se acentúa en oftalmología veterinaria, dada la limitada colaboración de los pacientes. De todo lo anterior se deduce que el microscopio especular de no contacto, a pesar de mostrar un campo de visión mucho menor, es potencialmente una herramienta más útil para el estudio del endotelio corneal en animales, ya que no requiere anestesia y es, aún si cabe, menos invasiva.

Figura 10. Microfotografía del endotelio corneal de un perro obtenida con un microscopio especular de no contacto (SP-2000P, Topcon).



Es importante mencionar, que los microscopios especulares actuales suelen llevar incorporado un **paquímetro digital** que permite medir el grosor corneal simultáneamente. La obtención de este valor es de gran utilidad, dado que está íntimamente ligado a la integridad del endotelio corneal; en lesiones del endotelio corneal, el humor acuoso entra en el estroma corneal, induciendo edema y aumentando, por tanto, el grosor corneal total.

La microscopía especular sin embargo conlleva algunas **limitaciones**. La más importante es la necesidad de tener una córnea relativamente transparente para poder obtener buenas imágenes, es decir, en casos de edema estromal severo o pliegues en la membrana de Descemet, puede ser difícil o incluso imposible obtener una imagen del endotelio corneal. Por otro lado, las fotografías que ofrece se restringen a un único plano, cuándo una imagen tridimensional sería más útil para valorar de forma más precisa el estado del endotelio corneal en estudio. ⁽⁶⁹⁾

En oftalmología veterinaria, el microscopio especular se ha usado para describir las características del endotelio corneal en animales tales como el perro, ⁽⁷⁰⁾ el conejo, ^(24,71) la llama, ⁽³⁴⁾ la alpaca, ⁽³⁴⁾ el caballo, ⁽³⁵⁾ el macaco cangrejero, ⁽⁷²⁾ el tití común, ⁽⁷³⁾ el gato, ⁽²²⁾ la chinchilla, ⁽⁷⁴⁾ o el pollo. ⁽⁷⁵⁾

2.4.2.3. Biomicroscopía confocal

En 1940, Hans Goldmann fotografió la córnea animal *ex vivo* mediante una lámpara de hendidura modificada que años después se ha considerado por algunos autores como el primer sistema óptico confocal. ⁽⁷⁶⁾ Sin embargo, muchos historiadores otorgan la invención del microscopio confocal a Marvin Minsky, quién patentó su invento en 1957, permitiéndole observar redes neuronales del tejido nervioso del cerebro *in vivo*. ⁽⁷⁷⁾

En la biomicroscopía confocal, la luz es emitida desde un **condensador** a través de un **agujero estenopeico** (un agujero central en una superficie opaca) y se enfoca sobre un tejido mediante una lente. La luz reflejada por el tejido se separa de la luz emitida y se capta por una segunda lente que la enfocará hacia otro agujero (**agujero de observación**), dónde será captada por un **detector**. El nombre de microscopio confocal se debe a que el iluminador del microscopio (condensador) y el sistema de observación tienen **puntos focales comunes** sobre el tejido en estudio ("confocales") (Fig.11). El detector es capaz de oscurecer aquella luz que no haya sido reflejada directamente por el tejido, aumentando la resolución de la imagen.

En oftalmología, la microscopía confocal permite obtener imágenes en serie en forma de secciones ópticas de la córnea, proporcionando información *in vivo*, tanto cuantitativa, como cualitativa.

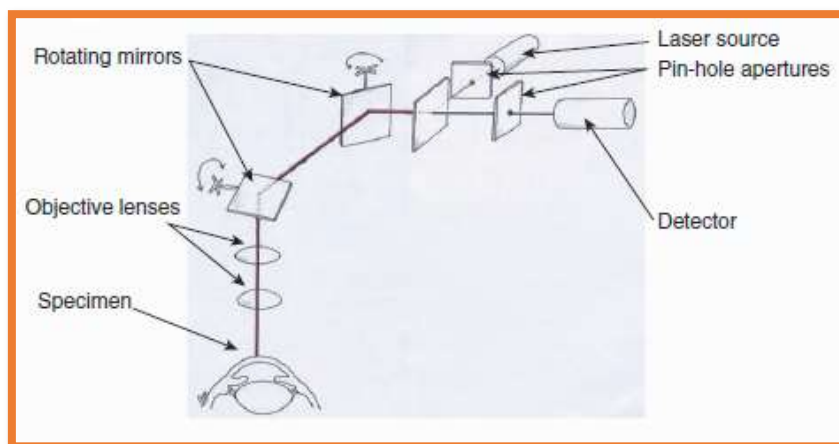


Figura 11. Imagen esquemática del principio de microscopía confocal. (Fuente: D. Donaldson, C.Hartley. *Ophthalmic examination and diagnostics, part 2: ocular imaging*. En: *Veterinary Ophthalmology*, 5th edition. Wiley-Blackwell, Iowa 2013:614-668).

En la actualidad hay 3 tipos básicos de microscopios confocales. El **Tandem Scanning Confocal Microscope** (TSCM) dispone de discos rotatorios con múltiples agujeros estenopeicos (discos Nipkow) que generan múltiples puntos de iluminación; con la rotación de dichos discos, se obtiene un escaneo completo de la muestra. El TSCM fue reemplazado por el **Slit-scanning Confocal Microscope** (SSCM), el cual dispone de una fuente de iluminación y observación en forma de hendidura. A pesar de que con el SSCM la imagen solo es confocal en un eje, este tipo de microscopios ofrece mayor fuente de iluminación y menores tiempos de escaneo que el TSCM (dado que todos los puntos del eje de la hendidura son escaneados a la vez). Finalmente, el **Laser Scanning Confocal Microscope** (LSCM) utiliza una fuente de luz láser de alta intensidad que atraviesa un pequeño agujero circular situado en un diafragma y dispone de diferentes lentes oscilantes que permiten escanear el tejido punto por punto. Mediante diferentes escaneos se pueden obtener imágenes bidimensionales, e incluso alterando el plano focal y con ayuda de un soporte informático, puede reconstruir simulaciones tridimensionales de la muestra. ⁽⁷⁸⁾

Tanto la microscopía especular como la confocal pueden emplearse *in vivo*, considerándose técnicas no invasivas que permiten evaluar cuantitativamente el endotelio corneal. Sin embargo, la ventaja que ofrece la microscopía confocal es que puede realizarse en casos de edema corneal severo y por este motivo, es de gran valor diagnóstico en algunos casos de enfermedad endotelial severa. ⁽⁶⁹⁾

A pesar de que la microscopía confocal se ha utilizado ampliamente en investigación y clínica humana, su elevado coste hace que el uso en veterinaria sea, a día de hoy, limitado (Fig. 12). ^(11,79)

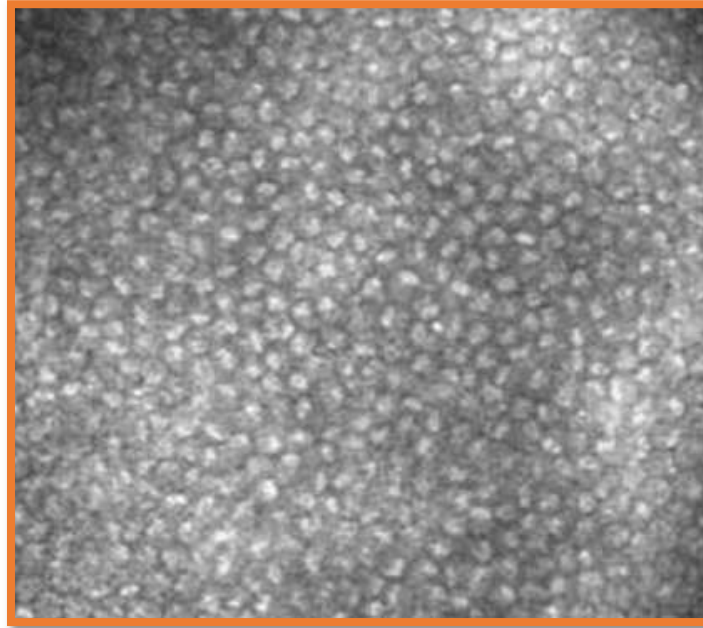


Figura 12. Imagen obtenida mediante microscopía confocal del endotelio corneal de un perro (Fuente: C. Kafarnik, J. Fritsche, S. Reese. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Veterinary Ophthalmology* 2007; 10(4): 222-230)

3. ENDOTELIOPATÍAS

Numerosas causas pueden dañar, de forma primaria o secundaria, el endotelio corneal. A pesar de que en medicina humana las enfermedades primarias del endotelio se han descrito ampliamente, en veterinaria la descripción de dichas patologías se limita básicamente a la especie canina. Los procesos primarios, es decir, aquellas enfermedades en las que la causa inicial se halla en el propio endotelio, son poco frecuentes en el perro y más difíciles de diagnosticar, dado que no presentan signos clínicos más allá de aquellos que aparecen en la córnea. Los procesos secundarios suelen observarse con más frecuencia y pueden estar asociados a enfermedades o procesos intraoculares o sistémicos.

3.1. Endoteliopatías primarias

3.1.1. Distrofia de Fuchs / Distrofia Endotelial Corneal

En 1910, el oftalmólogo austriaco Ernst Fuchs describió una serie de casos que presentaban opacidad de la córnea central, pérdida de sensibilidad corneal y formación de protuberancias en el epitelio corneal (bullas). A esta enfermedad la llamó “dystrophia epithelialis corneae”.⁽⁸⁰⁾ No fue hasta una década después,

que se asociaron los cambios observados en el epitelio con alteraciones en la membrana de Descemet y el endotelio. Por ejemplo, Vogt describió, mediante lámpara de hendidura, el crecimiento de unas excrecencias en forma de gota (*guttae*).⁽⁸¹⁾ Unos años más tarde, en 1925, se afirmó que los cambios endoteliales de esta enfermedad preceden a los epiteliales.⁽⁸²⁾

A pesar de haber transcurrido más de un siglo desde las primeras descripciones, y de ser actualmente la principal distrofia endotelial en humanos, el mecanismo desencadenante de la Distrofia de Fuchs sigue siendo **desconocido**. En una primera fase de la enfermedad se observa **aumento de grosor** de la membrana de Descemet y crecimiento de protuberancias anómalas en forma de gota (*guttae*), así como **disminución de la DCE**. El declive del número de células endoteliales es tal, que suelen alcanzarse los límites críticos de densidad y el endotelio es incapaz de ejercer correctamente su función, entrando grandes cantidades de humor acuoso desde la cámara anterior al estroma corneal y generando **intenso edema difuso**. En las últimas etapas de la enfermedad, el epitelio se desprende de su membrana basal, formando protuberancias conocidas como **bullas epiteliales**, que pueden romperse y dar lugar a dolorosas **úlceras superficiales** que se acompañan de signos inflamatorios corneales, tales como **neovascularización corneal**.^(83,84)

La Distrofia de Fuchs es una enfermedad hereditaria autosómica dominante, bilateral y progresiva que se observa más frecuentemente en mujeres adultas entre los 50 y los 60 años de edad.⁽⁸³⁾ A pesar de que es una enfermedad que inicialmente produce simplemente visión borrosa, si no se trata, los pacientes acaban desarrollando **ceguera completa** en fases avanzadas.

En humanos, la enfermedad se presenta en todo tipo de poblaciones, aunque algunos estudios sugieren mayor prevalencia en países europeos. En Estados Unidos se ha descrito una prevalencia del 3.9% en personas mayores de 40 años⁽⁸⁵⁾ mientras que en Islandia es del 9.2% en mayores de 55 años.⁽⁸⁶⁾

En la especie canina esta enfermedad recibe el nombre de **Distrofia Endotelial Corneal** y presumiblemente presenta las mismas etapas y signos clínicos que la Distrofia de Fuchs. Además de dichas similitudes, también es frecuente

observarla en hembras adultas a partir de 5 años de edad, describiéndose predisposición racial en Boston Terrier, Chihuahua y Teckel. ⁽⁸⁷⁾

El **diagnóstico** se realiza en base a la biomicroscopía y la microscopía especular y/o confocal. De hecho, en pacientes humanos sin antecedentes familiares, esta enfermedad suele diagnosticarse casualmente durante la revisión oftalmológica rutinaria, en dónde se observan las *guttæ* con la lámpara de hendidura. ⁽⁸⁴⁾ La confirmación de la sospecha clínica debe realizarse mediante microscopía especular o confocal. ⁽⁸⁸⁾ Bajo el microscopio especular, se observan las *guttæ* como estructuras hiporefectivas, además de zonas negras en el patrón endotelial, sugestivas de muerte celular (Fig.13).

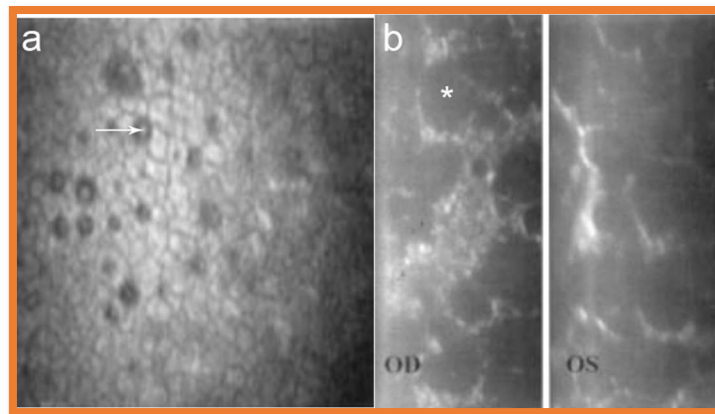


Figura 13. Microscopía especular de un paciente humano con Distrofia de Fuchs a) Nótese las *guttæ* (flecha) y las amplias áreas de muerte celular b) (*). (Fuente: A. G-Y. Chou, S.C. Kaufman, R.W. Beuerman *et al.* Confocal microscopy in cornea guttata and Fuchs' endothelial dystrophy. *British Journal of Ophthalmology* 1999; 83:185-189).

A pesar de que hay diferentes tratamientos paliativos para la Distrofia de Fuchs y la Distrofia Endotelial Corneal, el **trasplante corneal** (ya sea perforante o laminar profundo) es la única opción, hoy en día, para resolver la enfermedad de forma definitiva.

3.1.2. Distrofia Polimórfica Posterior

En 1916, Koeppe realizó la primera descripción de la Distrofia Polimórfica Posterior (DPP) al observar lesiones “bullosas” en la córnea posterior en 6 pacientes. ⁽⁸⁹⁾ No fue hasta varias décadas más tarde, en 1953, que se determinó el tipo de heredabilidad de la enfermedad, estableciéndose como **autosómica dominante**. ⁽⁹⁰⁾ Los primeros estudios histopatológicos de la DPP se realizaron en 1967, describiéndose el aumento irregular del tamaño de la membrana de

Descemet, así como protrusiones de esta membrana hacia la cámara anterior.
(91)

Actualmente la DPP se describe como una enfermedad congénita autosómica dominante, debida a una mutación en la región pericéntrica del cromosoma 20.
(92) La presentación clínica no muestra predisposición racial, es generalmente bilateral, y muestra alteraciones en endotelio corneal y en membrana de Descemet. (93) Los hallazgos más relevantes son opacidades polimórficas (algunas de ellas vesiculares), lesiones grandes geográficas y en algunos casos, bandas amplias en la membrana de Descemet. La DPP además suele asociarse con otras alteraciones del segmento anterior del globo ocular, tales como sinequias anteriores y glaucoma. (93,94)

A pesar de considerarse congénita, la enfermedad permanece **asintomática** hasta la edad adulta, siendo probablemente estacionaria o de progresión extremadamente lenta, tanto que los pacientes afectados mantienen su agudeza visual sin edema durante su vida. (94)

En el perro, esta enfermedad tiene una presentación muy similar a la observada en humana, tanto en su modelo de herencia, como en las lesiones del endotelio y la membrana de Descemet. Los animales afectados suelen tener entre 1 y 7 años de edad, describiéndose mayor predisposición en la raza Cocker Spaniel Americano. (95)

El **diagnóstico** puede realizarse mediante **lámpara de hendidura**, aunque se precisa de microscopía especular y/o confocal para un estudio más detallado. Mediante biomicroscopía pueden observarse estructuras aparentemente vesiculares (que en realidad no lo son, al no contener ningún fluido) difusas o agrupadas, en el endotelio y la membrana de Descemet, así como lesiones amplias en forma de bandas (Fig.14). (94)

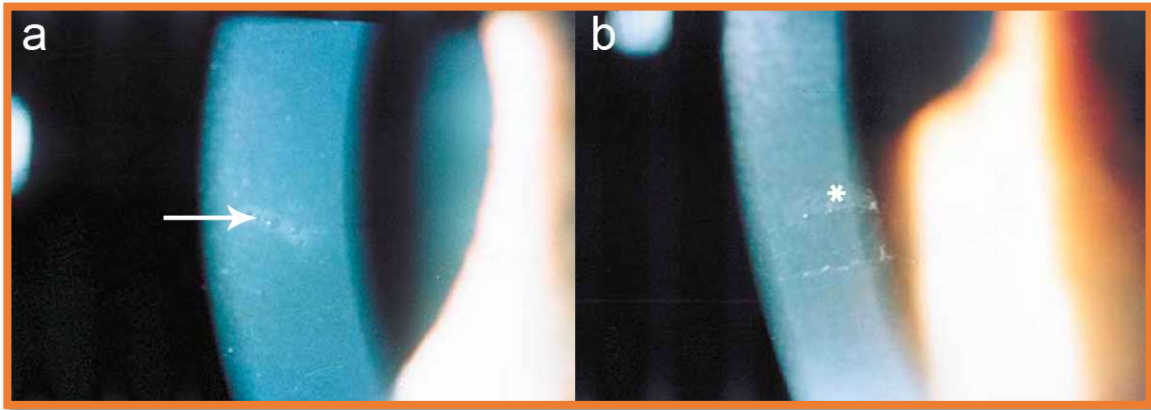


Figura 14. Examen con lámpara de hendidura en dos pacientes humanos con Distrofia Polimórfica Posterior en dónde pueden observarse: a) lesiones en forma de vesícula (aunque no contienen fluido) (flecha) y b) lesiones en forma de banda en la membrana de Descemet (*) (Fuente: J. Kiel. Posterior polymorphous dystrophy. *Clinical and Experimental Optometry* 1999; 82(1): 20-22)

Histológicamente, las células endoteliales pueden mostrar una apariencia normal o bien estar atenuadas, degeneradas o ausentes, aunque algunas presentan apariencia de fibroblasto o de célula epitelial. ⁽⁹⁴⁾ La microscopía, ya sea especular o confocal, permite observar las lesiones en banda de la membrana de Descemet y el aumento de polimegatismo y pleomorfismo de las células endoteliales (Fig.15). ⁽⁹⁶⁾

En la mayoría de DPP, la falta de clínica evidente **no justifica la aplicación de tratamiento**, aunque se ha descrito que aproximadamente en un 10% de pacientes la enfermedad puede progresar requiriendo tratamiento quirúrgico (trasplante corneal).

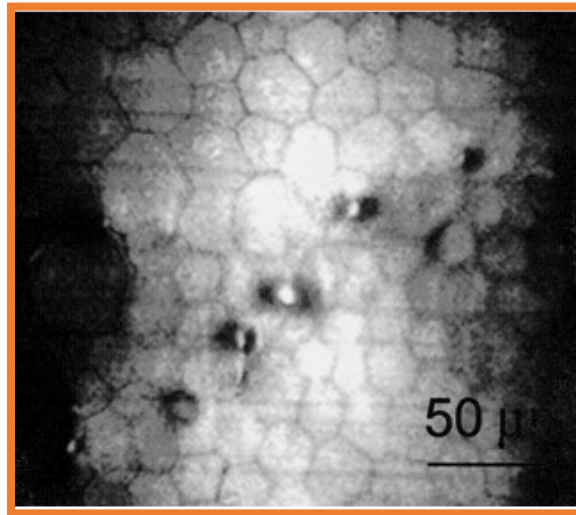


Figura 15. Microscopía confocal *in vivo* de un paciente humano con Distrofia Polimórfica Posterior en donde pueden observarse lesiones en forma de vesícula en el endotelio corneal. (Fuente: C.N. Grupcheva, G.S.M. Chew, M. Edwards et al. Imaging posterior polymorphous corneal dystrophy by in vivo confocal microscopy. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2001; 29: 256-259)

3.1.3. Degeneración endotelial senil

La degeneración endotelial senil (DES) es una enfermedad que puede observarse en perros de **avanzada edad**, en los cuales se desarrolla **edema corneal difuso espontáneo** de mayor o menor severidad, sin otros signos oculares o sistémicos asociados, y sin causa desencadenante aparente. Las escasas descripciones clínicas que existen en esta especie apuntan a que se trata de una patología sin **predisposición sexual o racial** y, desafortunadamente, no hay estudios científicos publicados sobre la misma.

Del mismo modo que la DCE disminuye de forma fisiológica durante el envejecimiento, la cantidad de bombas endoteliales y su capacidad funcional también son menores con el paso de los años. ⁽⁹⁷⁾ En oftalmología humana se han descrito casos de edema corneal espontáneo en pacientes geriátricos con historia previa de cirugía intraocular o glaucoma. La disminución de la celularidad, así como del número de bombas y su función, sumado a factores previos externos que, *per se*, produzcan daño endotelial, podrían explicar la aparición del edema durante la tercera edad. Sin embargo, en los casos observados en la especie canina, no se presenta historia de cirugía o enfermedad intraocular durante la vida del animal, por lo tanto, la causa exacta por la cual acaban

desarrollando edema **se desconoce**. Se podría hipotetizar que estos animales presentan una densidad celular cercana al “umbral bajo” de lo que se considera normal para la especie y que, con la disminución debida al envejecimiento, tanto en número de células endoteliales como en bombas, acaban llegando a los límites críticos que inducen la aparición de edema.

Estos casos suelen tratarse empíricamente con sustancias hiperosmóticas tóxicas (cloruro sódico al 5%) aunque, si las condiciones del paciente lo permiten, el tratamiento quirúrgico, ya sea mediante trasplante corneal o técnicas paliativas (*cross-linking*, termoqueratoplastia o colgajo conjuntival), sería el de elección en cuadros severos de edema corneal y ulceración recidivante secundaria.

3.2. Endoteliopatías secundarias

3.2.1. Procesos intraoculares

Entre las enfermedades intraoculares más frecuentes que pueden producir endoteliopatías secundarias cabe destacar la uveítis anterior, el glaucoma y la luxación anterior del cristalino.

La inflamación intraocular que se genera en casos de **uveítis anterior** aumenta la permeabilidad del endotelio y altera la capacidad funcional de la bomba endotelial. ^(98–101) En estos casos, el examen detallado del endotelio bajo microscopía especular revela disminución en DCE, acompañada de aumento del polimegatismo y pleomorfismo. Además, pueden observarse precipitados queráticos y vacuolas intercelulares llenas de fluido. ⁽¹⁰¹⁾

La compresión sobre el endotelio corneal producida por el aumento de presión en caso de **glaucoma** parece el mecanismo más probable de daño endotelial en esta enfermedad. ⁽¹⁰²⁾ El edema corneal difuso observado responde a dos etapas del mecanismo patogénico; en una primera fase hay afección de la bomba endotelial, mientras que en la segunda fase aparecen daños celulares endoteliales: ruptura celular, hinchazón de mitocondrias, desorganización del retículo endoplasmático y aparición de cuerpos mielínicos. ⁽⁵⁹⁾ La hipoxia sufrida por las células, además, podría conllevar daños endoteliales irreversibles. ⁽¹⁰³⁾ La microscopía especular y/o confocal puede desvelar cambios en la morfología

celular, así como disminución de la DCE. ⁽¹⁰²⁾ Además, el problema endotelial podría exacerbarse durante el tratamiento del glaucoma, dado que el uso crónico de productos antihipertensivos tales como los **inhibidores de la anhidrasa carbónica** podrían afectar a la bomba activa endotelial disminuyendo su funcionalidad. ⁽¹⁰⁴⁾

El roce directo que ejerce el cristalino sobre el endotelio corneal en casos de **luxación anterior** es el mecanismo principal por el que se produce el daño endotelial y la aparición de edema en esta alteración intraocular. ⁽¹⁰⁵⁾ En humanos, se han observado gotas endoteliales, células anormales y puntos negros en el patrón endotelial en casos de luxación. ⁽¹⁰⁶⁾

Cirugías intraoculares, como la extracción del cristalino o la facoemulsificación, también suelen ir asociadas a daño endotelial, siendo estos mayores en la primera. ⁽¹⁰⁷⁾ El daño endotelial se ha asociado al instrumental, a la manipulación del núcleo del cristalino, y, en el caso de la facoemulsificación, a la potencia de los ultrasonidos y la duración del proceso quirúrgico. ⁽¹⁰⁸⁾

3.2.2. Causas sistémicas

Entre las enfermedades sistémicas que cursan con alteraciones secundarias del endotelio, cabe destacar la diabetes mellitus y la hepatitis infecciosa canina.

Los altos niveles de glucemia presentes en la **diabetes mellitus** se han asociado a daño endotelial, concretamente al descenso de la DCE y al aumento del AMC, pleomorfismo y polimegatismo. ^(109–112)

Un 20% de los casos diagnosticados con **hepatitis infecciosa canina** (causada por adenovirus tipo 1 – CAV1) acaba desarrollando signos clínicos oculares. ⁽¹¹³⁾ Las lesiones se presentan tras 1-3 semanas de la infección, suelen ser unilaterales ⁽¹¹⁴⁾ y cursan principalmente con edema corneal difuso severo. Por este motivo, la enfermedad también se conoce como “**enfermedad del ojo azul**”. La vacunación con cepas vivas de CAV1 se asocia también a signos oculares (0.4%), habiéndose descrito, aunque de forma esporádica, signos parecidos en animales vacunados con cepas atenuadas de CAV2. ⁽¹¹⁵⁾ El edema corneal es consecuencia de una reacción de hipersensibilidad tipo III, en la que el antígeno, que se encuentra en las células endoteliales, desencadena la cascada inflamatoria en la cámara anterior, donde se producirán anticuerpos que se

unirán a los antígenos del endotelio, formando inmunocomplejos que serán fagocitados principalmente por células inflamatorias de respuesta aguda. ⁽¹¹⁶⁾

A parte de las dos enfermedades sistémicas anteriormente citadas, hay numerosas causas externas al globo ocular que son potencialmente dañinas para el endotelio corneal, entre ellas cabe destacar la radiación ultravioleta y los fármacos oculares (o sus excipientes), administrados por vía tópica o intracameral. ^(117,118)

Hipótesis

HIPÓTESIS EN LA ESPECIE OVINA

- La **densidad celular, el tamaño y la forma** de las células endoteliales, así como el **grosor corneal** en ovino, son similares a los descritos anteriormente en otros mamíferos.
- Hay variaciones en la densidad celular y en el grosor corneal entre **diferentes zonas** de la córnea en la especie ovina.
- La **edad** afecta a los parámetros endoteliales y al grosor corneal en la especie ovina.
- La **raza** afecta a los parámetros endoteliales y al grosor corneal en la especie ovina.

HIPÓTESIS EN LA ESPECIE CAPRINA

- La **densidad celular, el tamaño y la forma** de las células endoteliales, así como el **grosor corneal** en caprino, son similares a los descritos anteriormente en otros mamíferos.
- Hay variaciones en la densidad celular y en el grosor corneal entre **diferentes zonas** de la córnea en la especie caprina.
- La **edad** afecta a los parámetros endoteliales y al grosor corneal en la especie caprina.

HIPÓTESIS EN EL CÁRABO COMÚN (*Strix aluco*)

- La **densidad celular, el tamaño y la forma** de las células endoteliales en el cárabo común son similares a los descritos anteriormente en otras especies de aves.
- La **edad** afecta a los parámetros endoteliales en el cárabo común.

HIPÓTESIS EN LA ESPECIE CANINA

- El **índice cefálico** en el perro afecta a los parámetros endoteliales y el grosor corneal en esta especie.

Objetivos

OBJETIVOS EN LA ESPECIE OVINA

- Determinar la **densidad celular, el tamaño y la forma** de las células endoteliales, así como el **grosor corneal** en ovinos y comparar los resultados obtenidos con los publicados en otros mamíferos.
- Describir las variaciones entre **diferentes zonas** de la córnea en referencia a la densidad celular y el grosor corneal en ovinos.
- Describir los efectos de la **edad** en los parámetros endoteliales y en el grosor corneal en la especie ovina.
- Describir los efectos de la **raza** en los parámetros endoteliales y en el grosor corneal en la especie ovina.

OBJETIVOS EN LA ESPECIE CAPRINA

- Determinar la **densidad celular, el tamaño y la forma** de las células endoteliales, así como el grosor corneal en caprinos y comparar los resultados obtenidos con los publicados en otros mamíferos.
- Describir las variaciones entre **diferentes zonas** de la córnea en referencia a la densidad celular y el grosor corneal en caprinos.
- Describir los efectos de la **edad** en los parámetros endoteliales y en el grosor corneal en la especie caprina.

OBJETIVOS EN EL CÁRABO COMÚN (*Strix aluco*)

- Determinar la **densidad celular, el tamaño y la forma** de las células endoteliales en el cárabo común y comparar los resultados obtenidos con los publicados en otras especies de aves.
- Describir los efectos de la **edad** en los parámetros endoteliales en el cárabo común.

OBJETIVOS EN LA ESPECIE CANINA

- Describir los efectos del **índice cefálico** en los parámetros endoteliales y el grosor corneal en el perro.

Estudio 1

Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes

Natalia Coyo,* Maria Teresa Peña,*† Daniel Costa,* José Ríos,‡ Rodrigo Lacerda† and Marta Leiva*,†

*Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; †Servei d'Oftalmologia de la Fundació Hospital Clínic Veterinari, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; and ‡Biostatistics and Data Management Core Facility, IDIBAPS – Hospital Clínic, Laboratory of Biostatistics & Epidemiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Address communications to:

M. Leiva

Tel.: +34 93 5811387

Fax: +34 93 5813428

e-mail: marta.leiva@uab.cat

Abstract

Objective The purpose of the study was to determine corneal thickness (CT), endothelial cell density (ECD), morphology, and morphometry in ovine eyes, and to report the effects of age and breed on these parameters.

Animals studied and procedures Forty-eight healthy ovine eyes were classified into six groups (eight eyes per group) according to animals' age (lambs and adults) and breed (Manchega, Ripollesa, and Rasa Aragonesa). Endothelial cell density (cells/mm²) and CT (μm) were calculated in the central cornea and four peripheral quadrants by means of specular microscopy. Mean cell area (MCA (μm²)), pleomorphism (% hexagonal cells), and polymegethism (CV) were evaluated in the central cornea. Statistics consisted of an ANOVA model and a LSD test for the *post hoc* analysis.

Results Results in lambs were as follows: ECD = 3532 ± 259, CT = 699 ± 56, MCA = 283 ± 22, % hexagonal cells = 75.64 ± 3.09, and CV = 18 ± 8.4; and in adults: ECD = 2204 ± 261, CT = 804 ± 87, MCA = 473 ± 53, % hexagonal cells = 69.9 ± 3.42, and CV = 18.1 ± 5.2. There were differences ($P < 0.001$) in all parameters studied between both groups except for the CV ($P = 0.962$). Regarding the breed, Rasa Aragonesa presented a higher CT ($P = 0.001$) and CV ($P = 0.04$) compared to other breeds. Mean values of all groups together showed that central and dorsal areas of the cornea were the thickest, whereas temporal quadrant was the thinnest ($P < 0.001$).

Conclusions This study demonstrates that age and breed influence corneal and endothelial parameters in sheep.

Key Words: endothelium, eye, pleomorphism, polymegethism, sheep, specular microscopy

INTRODUCTION

The corneal endothelium is a monolayer of polygonal cells on the inner surface of the cornea that faces the anterior chamber. This corneal layer governs fluid and solute transport across the posterior surface of the cornea and actively maintains the cornea in the slightly dehydrated state that is required for optical transparency. A minimum density of endothelial cells is necessary to ensure a proper function of the endothelium as disturbances of this critical density are associated with loss of corneal transparency.¹

Currently, noncontact specular microscopy is considered the most accurate noninvasive technique for visualiz-

ing and analyzing the corneal endothelium '*in vivo*'. Morphologic and morphometric studies of the healthy endothelium using this technique have been widely described in human,² dog,³ rabbit,^{4,5} llama,⁶ alpaca,⁶ horse,⁷ cynomolgus monkey,⁸ common marmoset,⁹ and cat.¹⁰ Corneal endothelium has also been characterized by means of scanning electron microscopy in ostrich,¹¹ magellanic penguin,¹² and pig¹³ and by confocal microscopy in rat and mouse.¹⁴

Furthermore, differences in endothelial cell density (ECD), cell morphology, and morphometry have been reported with age in humans,^{2,15} dogs,^{16,17} cats,^{10,17} horses,⁷ pigs,¹⁷ cows,¹⁷ and rabbits.^{4,18} However, there are no morphologic nor morphometric studies of the healthy

368 COYO ET AL.

sheep endothelium, nor studies on the effects of age and breed on these parameters.

Corneal thickness (CT) is a sensitive parameter to determine corneal hydration and metabolism. When corneal endothelial pump function or integrity of the corneal endothelial barrier is disturbed, an overhydration of the corneal stroma occurs, and therefore, CT increases.¹ Central corneal thickness (CCT) has been assessed in the human¹⁹ and in different domestic and laboratory animals including the dog,^{3,16} the rabbit,⁴ the llama,⁶ the alpaca,⁶ the horse,⁷ the cat,¹⁰ the mouse,²⁰ the pig,²¹ the one-humped camel,²² and a single sheep.¹⁴ CT has been previously evaluated in central and peripheral quadrants in human,²³ horse,⁷ llama,⁶ alpaca,⁶ mouse,²⁰ dog,²⁴ cat,²⁵ and rabbit eyes.²⁶ Furthermore, an increase in CT has been reported with age in humans,^{2,15} dogs,^{16,17,24} cats,^{10,17} pigs,¹⁷ cows,¹⁷ and rabbits.^{5,18} Although differences of corneal thickness among races have been described in humans,^{27–29} there are no studies on the effects of breed in veterinary medicine.

The purpose of this study was to determine CT, ECD, size, and shape of corneal endothelial cells in sheep, and to report the effects of age and breed on these corneal parameters. Knowledge of corneal endothelial features in sheep is essential for research studies using this specie as an animal model of corneal endothelial damage.

MATERIALS AND METHODS

Animals, sampling, and ophthalmologic examination

Forty-eight healthy eyes from three Spanish breeds of sheep were obtained from two Spanish slaughterhouses, as well as from the research-teaching colony of the Autonomous University of Barcelona. Immediately after being sacrificed, eyes were enucleated and classified into six groups (eight eyes each), based on the breed (Ripollesa, Manchega and Rasa Aragonesa) and the age of the animals (lambs [3–6 months old] and adult sheep [2–5 years old]). Sample size was based on previous publications using the same methods and procedures in other species.^{7,10} Data regarding gender could not be obtained.

Eye cooling was carried out in the slaughterhouse itself, by introducing the globes in individual bags with Ringer's lactate solution and then placing the bags in a cooler with ice. Eyes were cold-transported to the laboratory of the Ophthalmology Service of the Autonomous University of Barcelona, where a biomicroscopic examination of the anterior segment was performed (Kowa SL-15 portable Slit-Lamp Biomicroscope; Kowa Co. Ltd) within 3 h of enucleation. Eyes with anterior segment abnormalities were excluded from the study.

Establishment of the four eye quadrants (dorsal, ventral, nasal, and temporal) was performed by means of fundic examination (Heine Omega 500 indirect ophthalmoscope; Heine), anatomic location of the optic nerve exit (ventromedial), and pupil and corneal shape (narrow in temporal

quadrant). Immediately after, to identify the corneal quadrants, medial conjunctiva and dorsal conjunctiva were identified with different color suture materials.

Density of corneal endothelial cells, pleomorphism, and polymegethism

Corneas were studied within 4–12 h after enucleation. Eyes were placed in a homemade methacrylate eyeball holder and examined using a noncontact specular microscope (Specular Microscope SP-2000P; Topcon) in an automatic mode with a working distance of 25 mm. Eyes that showed corneal decompensation, damage of endothelial cells, endothelial cell loss, or presence of inflammatory cells on the endothelium during the specular microscopy examination were excluded from the study.

Endothelial cell density, expressed as cell/mm², was calculated in the central and peripheral corneal quadrants (dorsal, ventral, nasal, and temporal). Peripheral frames were taken approximately 5 mm from the limbus. Three microphotographs were obtained from each zone, and the mean ECD was calculated for each quadrant. In all central micrographs, thirty well-defined endothelial cells were closely evaluated for morphological parameters including the following: mean cell area ($\mu\text{m}^2 \pm$ standard deviation), polymegethism (measured by the coefficient of variation of cell area), and pleomorphism (evaluated by the percentage of cells that were hexagonal (i.e. had six sides)) (Fig. 1). Pleomorphism was analyzed by means of imaging software (Adobe Photoshop CS5; Adobe Systems Inc), by two independent researchers. The mean of the results obtained by the two investigators was considered as the final value.

Corneal pachymetry

Corneal thickness (μm) was measured using the digital pachymeter of the same noncontact specular microscope in an automatic mode. In all the eyes, three measurements at the five previously described quadrants (central, dorsal,

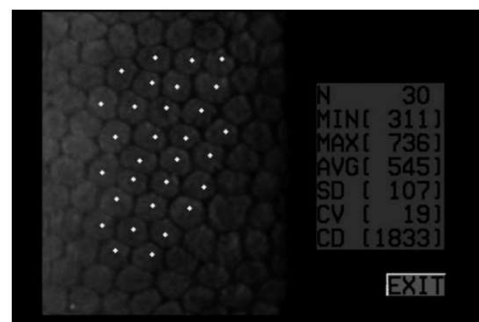


Figure 1. Selection of thirty well-defined corneal endothelial cells in a central microphotograph of an adult Manchega. N, number of cells chosen; AVG, mean cell area (μm^2); CV, coefficient of variation (indicates polymegethism); CD, endothelial cell density (cells/mm²).

Table 1. Endothelial cell density (ECD, cells/mm²), corneal thickness (CT, μ m), mean cell area (MCA, μ m²), pleomorphism (% of hexagonal cells), and polymegethism (CV) according to age in ovine eyes. Results are given with the mean values \pm standard deviation (SD)

	ECD	CT	MCA	Pleomorphism	Polymegethism
Lambs (3–6 months)	3532 \pm 259	699 \pm 56	283 \pm 22	75.64 \pm 3.09	18 \pm 8.4
Adult sheep (2–5 years)	2204 \pm 261	804 \pm 87	473 \pm 53	69.9 \pm 3.42	18.1 \pm 5.2
<i>P</i> -value	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.962

*Indicates statistical significance.

ventral, nasal, and temporal) were obtained. Peripheral measurements were taken approximately 5 mm from the limbus, and mean CT was calculated for each quadrant.

Statistical analyses

The main effects of age, breed, and quadrant were analyzed by means of one-way ANOVA models using mean CT, ECD, MCA, pleomorphism, and polymegethism as dependent variables. To study a specific interaction effect of a pair of these factors, an ANOVA model was used including the pair of factors as main effect and their interaction, to corroborate the hypothesis of an independent influent factor for the dependent variable. Least significant differences (LSD) procedure was used in *post hoc* analyses. Statistical analysis was performed with commercially available computer software (SPSS ver 20), and a 5% bilateral Type I error was used for statistical significance. Results are given with the mean value \pm standard deviation (SD).

RESULTS

Mean CT, ECD, MCA, pleomorphism, and polymegethism values for ovine corneas are shown in Table 1.

Age evaluation

The effect of age on corneal parameters is shown in Table 1. These results were obtained by calculating the mean values for the three breeds in each of the two groups of ages. When compared, lambs had a significantly higher ECD but a significantly lower CT, MCA, and pleomorphism than adults ($P < 0.001$). No differences were observed in polymegethism between lambs and adults ($P = 0.962$) (Table 1).

Breed evaluation

Results of the effects of breed on corneal parameters are shown in Table 2. For breed evaluation, lambs and adults

Table 2. Endothelial cell density (ECD, cells/mm²), corneal thickness (CT, μ m), mean cell area (MCA, μ m²), pleomorphism (% of hexagonal cells), and polymegethism (CV) according to breed in ovine eyes (regardless of age). Results are given with the mean values \pm standard deviation (SD)

	ECD	CT	MCA	Pleomorphism	Polymegethism
Manchega	2917 \pm 810	744 \pm 91	382 \pm 119	73.54 \pm 3.61	15.4 \pm 4.2
Ripollesa	2883 \pm 455	724 \pm 56	362 \pm 61	72.33 \pm 4.96	16.3 \pm 6.2
Rasa Aragonesa	2804 \pm 820	787 \pm 104*	390 \pm 123	72.45 \pm 4.51	22.5 \pm 7.8*
<i>P</i> -value	0.593	0.001*	0.745	0.694	0.04*

*Indicates statistical significance.

of the same breed, as a whole, were compared to those of the other breeds. There were no differences regarding ECD ($P = 0.593$), MCA ($P = 0.745$), and pleomorphism ($P = 0.694$) among breeds. Nevertheless, Rasa Aragonesa presented a significantly higher CT ($P = 0.001$) and polymegethism ($P = 0.04$) than Manchega and Ripollesa.

Quadrant evaluation

Table 3 shows the results of quadrant evaluation for all the groups together. There were no differences in ECD among quadrants ($P = 0.854$), but dorsal and central thicknesses were significantly higher ($P < 0.001$), and temporal significantly thinner ($P < 0.001$). There were no differences between age or breed and quadrant evaluation.

Interaction among factors

An interaction between age and breed was found for ECD, CT, MCA, and polymegethism ($P < 0.001$).

DISCUSSION

The present study establishes corneal thickness and endothelial cell density, as well as characterizing corneal endothelial cells in the sheep. To the authors' knowledge, this is the first description of these parameters and their variations according to age and breed in a large number of ovine eyes.

Corneal thickness has only been described previously in a case report.¹⁴ The central CT obtained herein (768 \pm 72 μ m) is similar to the one in the case report by Reichard *et al.* (850 μ m),¹⁴ carried out by means of confocal microscopy in a 2-year-old sheep. Both studies yielded results within the lower range of those previously reported by Bayer (central CT: 800–2000 μ m). It is worth pointing out that Dr Bayer did not include data on the sample's size, age of the individual or breed.³⁰ Regarding the peripheral CT, the bibliographic references are even

370 COYO ET AL.

Table 3. Endothelial cell density (ECD, cells/mm²) and corneal thickness (CT, μ m) according to corneal quadrants in ovine eyes. Results are given with the mean values \pm standard deviation (SD)

	ECD	CT
Central quadrant	2845 \pm 749	768 \pm 72*
Dorsal quadrant	2854 \pm 740	793 \pm 92*
Medial quadrant	2869 \pm 708	727 \pm 79
Ventral quadrant	2805 \pm 736	759 \pm 94
Temporal quadrant	2966 \pm 653	712 \pm 88*
P-value	0.854	<0.001*

*Indicates statistical significance.

scarcer and limited again to the CT results reported by Dr Bayer (300–500 μ m), with no specification of the quadrant examined, age of the individual, nor of the specific localization for the measurement (mm from the limbus).³⁰ The peripheral CTs obtained in the present study (624–885 μ m) disagree with those previously described for sheep, and show a statistically significant difference between quadrants, the dorsal being the thickest (793 \pm 92 μ m) and the temporal the thinnest (712 \pm 88 μ m). Differences among quadrants have previously been reported in other animal species, including horses,⁷ mice,²⁰ pigs,³¹ dogs,²⁴ cats,³² and humans.³³

Corneal endothelial density has been widely studied in veterinary and human ophthalmology, in which many published reports are limited to the central cornea.^{3–14} In sheep, there is only a case report on the characterization of endothelial corneal cells,³⁴ yielding a central ECD of 11 319 \pm 2081 cells/mm² by means of scanning electron microscopy. This value differs greatly from the ones obtained in the present study (lambs: 3532 \pm 259 cells/mm²; adults: 2204 \pm 261 cells/mm²), as well as from the ECD values previously reported in other mammals.^{3–14} Unfortunately, the reason for this discrepancy remains unclear.

There are controversies regarding differences in ECD among corneal quadrants; some studies^{16,35,36} agree with the present one in that there are no differences, while others disagree.^{7,37} This variability could be explained by the different methods used or by the different location of the peripheral frames (distance from the limbus). Further research is needed to clarify and understand such differences among studies and to evaluate their clinical relevance.

Results obtained for MCA were 283 \pm 22 μ m² for lambs and 473 \pm 53 μ m² for adults. Comparisons with other animals are difficult, as in many reports authors do not specify the exact age of the subjects. However, our results are very similar to those previously reported for the dog (393 μ m²),³⁸ the cat (154 μ m² for kittens, 348 μ m² for adults),¹⁰ and the rabbit (371 μ m²).³⁸

Endothelial cell loss is associated with cellular morphological changes¹ which can be quantified by pleomorphism and polymegethism. The obtained results on hexagonal

cells (75.64 \pm 3.09% for lambs and 69.9 \pm 3.42% for adults) and CV (18 \pm 8.4 for lambs and 18.1 \pm 5.2 for adults) do not differ from those previously described for dogs (68%; CV = 22),³⁹ rabbits (71%; CV = 20),³⁸ and cats (CV = 19).⁴⁰

Age-related changes in the cornea have been examined widely, clinically, and experimentally, in human ophthalmology. Aging increases CT and pleomorphism, but reduces ECD (0.6% annually between ages of 20–80 years) in humans.^{2,15,41–44} Unfortunately, reports on the effects of aging on the cornea in veterinary medicine are scarce and limited to CT evaluation in dogs,^{16,17,24} cats,^{10,17} pigs,¹⁷ cows,¹⁷ horses,⁷ llamas/alpacas,⁶ and rabbits;^{5,18} to ECD determination in cats,¹⁰ dogs,¹⁶ llamas/alpacas,⁶ and horses;⁷ and to endothelial cell characterization in cats¹⁰ and dogs.¹⁶ The study reported here yielded very similar results to the previously described in humans,⁴⁴ dogs,¹⁶ and cats,¹⁰ observing an increase in CT and pleomorphism, but a reduction in ECD with aging. Despite the fact that reduction in ECD was significant, it does not justify the increase in CT, as it did not reach the critical minimum level (500–800 cells/mm²). The deposition of new material into the Descemet's membrane during their lifetime could explain in part this finding.¹ Nevertheless, further studies are needed to establish the precise mechanism of corneal thickening with age.

Regarding CV, there is some disagreement: some studies have reported an increase with aging in humans⁴⁵ and dogs,⁴⁶ whereas others did not find a relation between age and polymegethism in humans,⁴⁷ dogs,¹⁶ and cats.¹⁰ According to our results, aging does not seem to affect coefficient of variation in ovine eyes.

In human ophthalmology, significant differences in CT, ECD, and endothelial cell characterization between races have been reported.^{27–29,45} Surprisingly, neither differences of ECD nor MCA and pleomorphism could be found among the ovine breeds studied. However, Rasa Aragonesas presented a statistically significant higher CT and CV than Manchegas and Ripollesas. Such similarities could be explained by their same predecessor, *Ovis aries ligeriensis*,⁴⁸ and their very similar anatomic and productive features. Further research including different ovine breeds with different ancestors is needed to confirm that breed is a decisive factor and can vary endothelial parameters.

Finally, an interesting relationship between age and breed was found in all parameters except for pleomorphism. This finding suggests that the effect of age could be different depending on the breed studied. This means that future studies on the corneal endothelium in sheep should include different age groups for each breed studied.

A possible limitation of the study was the wide range of time between enucleation and specular microscopy evaluation (4–12 h). This time could not be reduced as some of the samples were collected far away from the laboratory.

However, to minimize possible variations of the endothelium due to the time elapsed, slit-lamp examination was performed in all eyes before the specular microscopy evaluation and eyes presenting any alteration seen by means of any of these two techniques were excluded from the study.

In conclusion, corneal thickness, density, and characterization of endothelial cells in sheep are very similar to those previously reported for other mammals and, excluding polymegethism, vary during lifetime. Based on the differences seen among corneal quadrants, the central cornea should not be considered as the sole representative of the whole cornea in ovine eyes.

REFERENCES

- Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye* 1990; **4**: 389–424.
- Abib FC, Barreto J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 2001; **27**: 1574–1578.
- Stapleton S, Peiffer RL Jr. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. *American Journal of Veterinary Research* 1979; **40**: 1803.
- Sailstad DM, Peiffer RL. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Laboratory Animals* 1981; **15**: 393–395.
- Morita H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. *Journal of Veterinary Medical Science* 1995; **57**: 273–277.
- Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *American Journal of Veterinary Research* 2002; **63**: 326–329.
- Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG *et al*. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *American Journal of Veterinary Research* 2001; **62**: 479–482.
- Morita H, Shimomura K, Sakuma Y. Specular microscopy of corneal endothelial cells in cynomolgus monkeys. *Journal of Veterinary Medical Science* 1994; **56**: 763–764.
- Morita H, Shimomura K. Specular microscopy of the corneal endothelial cells in common marmosets. *Journal of Veterinary Medical Science* 1996; **58**: 277–279.
- Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC *et al*. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. *Veterinary Ophthalmology* 2010; **13**: 222–226.
- Pigatto JAT, Franzen AA, Pereira FQ *et al*. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciência Rural* 2009; **39**: 926–929.
- Pigatto JAT, Laus JL, Santos JM *et al*. Corneal endothelium of the Magellanic penguin (*Spheniscus Magellanicus*) by scanning electron microscopy. *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 2005; **36**: 702–705.
- Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artoni SM, Laus JL *et al*. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural* 2009; **39**: 117–122.
- Reichard M, Hovakimyan M, Wree A *et al*. Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. *Current Eye Research* 2010; **35**: 1072–1080.
- Laule A, Cable MK, Hoffman CE *et al*. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Archives of Ophthalmology* 1978; **96**: 2031.
- Gwin RM, Lerner I, Warren JK *et al*. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1982; **22**: 267–271.
- Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK *et al*. Postnatal development of corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1986; **27**: 44–51.
- Von Sallmann L, Caravaggio LL, Grimes P. Studies on the corneal endothelium of the rabbit. I. Cell division and growth. *American Journal of Ophthalmology* 1961; **51**: 955–969.
- Ogbuehi KC, Almubrad TM. Repeatability of central corneal thickness measurements measured with the Topcon SP2000P specular microscope. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2005; **243**: 798–802.
- Henriksson JT, Bron AJ, Bergmanson JP. An explanation for the central to peripheral thickness variation in the mouse cornea. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2012; **40**: 174–181.
- Sanchez I, Martin R, Ussa F *et al*. The parameters of the porcine eyeball. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2011; **249**: 475–482.
- Osuobeni EP, Hamidzada WA. Ultrasonographic determination of the dimensions of ocular components in enucleated eyes of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Research in Veterinary Science* 1999; **67**: 125–129.
- Martola E-L, Baum JL. Central and peripheral corneal thickness: a clinical study. *Archives of Ophthalmology* 1968; **79**: 28.
- Gilger BC, Whitley RD, McLaughlin SA *et al*. Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *American Journal of Veterinary Research* 1991; **52**: 1570–1572.
- Gilger BC, Wright JC, Whitley RD *et al*. Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats. *American Journal of Veterinary Research* 1993; **54**: 228–230.
- Chan T, Payor S, Holden BA. Corneal thickness profiles in rabbits using an ultrasonic pachometer. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1983; **24**: 1408–1410.
- Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Comparison of the corneal endothelium in an American and a Japanese population. *Archives of Ophthalmology* 1985; **103**: 68.
- La Rosa FA, Gross RL, Orengo-Nania S. Central corneal thickness of Caucasians and African Americans in glaucomatous and nonglaucomatous populations. *Archives of Ophthalmology* 2001; **119**: 23.
- Hashemian MN, Moghimi S, Fard MA *et al*. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Iranian eyes. *BMC Ophthalmology* 2006; **6**: 9.
- Bayer J. Anatomie des Auges. In: *Tierärztliche Augenheilkunde*. Wilhelm Braumüller, Wien, 1914; 2–82.
- Faber C, Scherfig E, Prause JU *et al*. Corneal thickness in pigs measured by ultrasound pachymetry in vivo. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 2008; **35**: 39.
- Schoster JV, Wickman L, Stuhr C. The use of ultrasonic pachymetry and computer enhancement to illustrate the collective corneal thickness profile of 25 cats. *Veterinary & Comparative Ophthalmology* 1995; **5**: 68–73.
- Cho P, Cheung SW. Central and peripheral corneal thickness measured with the TOPCON specular microscope SP-2000P. *Current Eye Research* 2000; **21**: 799–807.
- Collin SP, Collin HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clinical and Experimental Optometry* 1998; **81**: 245–254.
- Blackwell WL, Gravenstein N, Kaufman HE. Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. *American Journal of Ophthalmology* 1977; **84**: 473–476.

372 COYO ET AL.

36. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO *et al.* Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Current Eye Research* 1985; **4**: 671–678.
37. Amann J, Holley GP, Lee S-B *et al.* Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *American Journal of Ophthalmology* 2003; **135**: 584–590.
38. Yee RW, Edelhauser HF, Stern ME. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Experimental Eye Research* 1987; **44**: 703–714.
39. Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2008; **28**: 427–430.
40. Cohen KL, Tripoli NK, Cervantes G *et al.* Cat endothelial morphology after corneal transplant. *Current Eye Research* 1990; **9**: 445–450.
41. Blatt HL, Rao GN, Aquavella JV. Endothelial cell density in relation to morphology. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1979; **18**: 856–859.
42. Murphy C, Alvarado J, Juster R *et al.* Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1984; **25**: 312–322.
43. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1997; **38**: 779–782.
44. Doughty MJ. A prospective analysis of corneal endothelial polymegethism and cell density in young adult Asians. *Clinical and Experimental Optometry* 2014; **97**: 256–263.
45. Arıcı C, Arslan OS, Dikkaya F. Corneal endothelial cell density and morphology in healthy Turkish eyes. *Journal of Ophthalmology* 2014; **2014**: 852624.
46. Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM *et al.* Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Veterinary Ophthalmology* 2006; **9**: 101–107.
47. Galgauskas S, Norvydaitė D, Krasauskaitė D *et al.* Age-related changes in corneal thickness and endothelial characteristics. *Clinical Interventions in Aging* 2013; **8**: 1445–1450.
48. Fuentes F, Sánchez J, Gonzalo G. *Tratado de Etnología Animal: Razas de Rumiantes y Monogástricos*. Diego Marín, Murcia, Spain, 2006.

Estudio 2

Corneal thickness, endothelial cell density, and morphological and morphometric features of corneal endothelial cells in goats

Natalia Coyo DVM, MS

Marta Leiva DVM, PhD

Daniel Costa DVM, PhD

José Ríos MS

Teresa Peña DVM, PhD

Received October 17, 2017.

Accepted February 1, 2018.

From the Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona (Coyo, Leiva, Peña), and the Servei d'Oftalmologia Veterinària, Fundació Hospital Clínic Veterinari, Campus UAB, Bellaterra, Spain, 08193 (Costa, Leiva, Peña); and the Biostatistics and Data Management Core Facility, IDIBAPS–Clinical Hospital of Barcelona, Barcelona, Spain 08036 (Ríos).

Address correspondence to Dr. Leiva (marta.leiva@uab.cat).

OBJECTIVE

To determine corneal thickness (CT), endothelial cell density (ECD), and morphological and morphometric features of caprine eyes and to assess effects of aging on these variables.

SAMPLE

27 healthy eyes of 19 Murciano-Granadina goats.

PROCEDURES

Goats were classified into 2 age groups (kids, 14 months old [14 eyes]; and adults, 7-10 years old [13 eyes]). ECD and CT were calculated in the central cornea and 4 peripheral quadrants using specular microscopy. Mean cell area (MCA), pleomorphism (percentage of hexagonal cells), and polymegathism were evaluated in the central cornea. Nonparametric analysis by means of rank-transformation with general linear models was used for statistical analysis.

RESULTS

Median values for kids were determined for ECD (3,831 cells/mm²; interquartile range [IQR], 3,669- 4,011 cells/mm²), CT (608 μm; IQR, 573-655 μm), MCA (255 μm²; IQR, 243-272 μm²), pleomorphism (80.53%; IQR, 78.83%-83.30%), and polymegathism (19; IQR, 18-22). Median values for adults were determined for ECD (2,101 cells/mm²; IQR, 1,966-2,251 cells/mm²), CT (706 μm; IQR, 670-730 μm), MCA (466 μm²; IQR, 425-507 μm²), pleomorphism (67.80%; IQR, 65.50%-70.00%), and polymegathism (21; IQR, 15-26). Values differed significantly between the 2 groups for all variables, except polymegathism. For both groups, the dorsal and temporal quadrants were the thickest and thinnest, respectively. In addition, ventral ECD was the lowest for both groups.

CONCLUSIONS AND CLINICAL RELEVANCE

ECD decreased with age, whereas MCA, pleomorphism, and CT increased. Moreover, differences among regions of the cornea indicated that the central cornea should not be considered as representative of the entire cornea. (*Am J Vet Res* 2018;79:xxx–xxx)

ABBREVIATIONS

CT	Corneal thickness
IQR	Interquartile range
ECD	Endothelial cell density
MCA	Mean cell area

The cornea in goats, similar to the cornea in many other animal species, is composed of 4 layers: epithelium, stroma, Descemet's membrane, and endothelium. The endothelium is a monolayer of polygonal cells on the inner surface of the cornea that faces the anterior chamber. Corneal endothelium governs fluid and solute transport across the posterior surface of the cornea to maintain a dehydrated state that is required for transparency.¹ To perform this function properly, a minimum ECD is required. In humans, the minimum ECD required is between 500 and 800 cells/mm².²

Noncontact specular microscopy is considered the criterion-referenced technique for visual examination and analysis of the corneal endothelium in vivo. A specular microscope projects a beam of light to the posterior surface of the cornea. Although most of the light is transmitted to the aqueous humor, a small part (0.022%) is reflected because of the higher refractive index of the endothelium, compared with that of the aqueous humor.³ Corneal endothelium has been evaluated by use of specular microscopy in humans⁴ and several other animal species.^{5–13}

Endothelial changes attributable to aging have been reported for humans^{4,14} and some other mammals.^{6,10,12,13,15-17} However, the authors are not aware of any morphological or morphometric studies that have been conducted on the healthy endothelium of goats. Furthermore, there have been no reports on differences of endothelial variables of goats of differing ages.

Corneal thickness is a variable that reflects corneal hydration and metabolism. Corneal thickness can increase as a result of overhydration of the corneal stroma, which results from disturbances of the endothelial pump or corneal endothelial barrier.¹ The CT in the central portion of the cornea and peripheral cornea has been evaluated in humans,¹⁸ horses,¹⁰ llamas and alpacas,¹¹ mice,¹⁹ dogs,²⁰ cats,²¹ rabbits,²² sheep,¹³ cows,²³ pigs,²³ and guinea pigs.²⁴ An increase in CT attributable to aging has been reported for humans^{4,14} and other animal species.^{8,12,13,15-17,20,25-28}

Although the CT of the central portion of the cornea of goats has been evaluated by means of ocular ultrasonography²⁹ and optical coherence tomography,³⁰ to the authors' knowledge, no studies have been conducted to evaluate CT of the various quadrants of the eyes of goats. Moreover, no studies have been conducted to evaluate the effects of age on CT in goats.

The purposes of the study reported here were to determine CT, ECD, and size and shape of caprine corneal endothelial cells and to assess differences in these variables between young and adult goats. Determining reference range values for endothelial variables and CT in goats would provide information necessary to evaluate the usefulness of this species for the study of corneal endothelial damage.

Materials and Methods

Samples

The study included 27 healthy eyes of 19 Murciano-Granadina goats. Goats were classified into 2 groups on the basis of age. Fourteen eyes were obtained from 10 kids (1 to 4 months old), and 13 eyes were obtained from 9 adults (7 to 10 years old). Eyes of kids were obtained from various abattoirs in Catalonia, whereas eyes of adults were obtained from goats that were part of the research-teaching colony of the Autonomous University of Barcelona and were euthanized for production reasons unrelated to the present study. Data regarding sex of goats could not be obtained.

Sampling and ophthalmic examination

Eyes were immediately enucleated from the goat cadavers. Eyes were introduced in a moist bag with lactated Ringer solution, and this in turn, in a cool chamber that contained ice packs. Eyes were transported on ice to the laboratory at the Autonomous University of Barcelona.

Ophthalmic examination of the anterior segment was performed by means of slit-lamp biomicroscopy^a within 3 hours after enucleation. Eyes with signs of diseases of the anterior segment were excluded.

Designation of the central portion of the cornea and the 4 quadrants (dorsal, ventral, nasal, and temporal) of each cornea was performed on the basis of results of fundus examination,^b anatomic location of the optic nerve (ventromedial), and shape of the pupil and cornea (narrow in the temporal quadrant). Immediately after quadrants were designated, colored sutures were placed in the medial and dorsal conjunctivae of each quadrant for identification purposes.

Evaluation of ECD, pleomorphism, and polymegathism

Corneas were evaluated within 2 to 6 hours after enucleation. Eyes were placed in a holder and examined by use of a noncontact specular microscope^c in automatic mode with values preset by the manufacturer. Working distance was 25 mm. Eyes were excluded from the study if they had evidence of corneal decompensation, damaged endothelial cells, endothelial cell loss, or inflammatory cells on the endothelium.

The ECD was calculated in the central portion of the cornea and the 4 peripheral quadrants of the cornea. Images for the peripheral quadrants were obtained approximately 5 mm from the limbus. Three photomicrographs were obtained from each location, and the mean ECD of each location was calculated. For all photomicrographs of the central portion of the cornea, 30 well-defined endothelial cells were evaluated to determine morphological variables that included MCA, polymegathism (measured as the coefficient of variation of cell area), and pleomorphism (percentage of cells that were hexagonal; **Figure 1**). To analyze pleomorphism, 2 investigators manually counted the sides of the 30 selected cells of each photomicrograph by use of image-editing software.^d

Corneal pachymetry

Corneal thickness was measured with the digital pachymeter (in automatic mode) of the noncontact specular microscope.^c For all eyes, 3 measurements at the 5 locations used for measurements of ECD (central portion of the cornea and dorsal, ventral, nasal, and temporal quadrants) were obtained, and the mean CT of each location was calculated.

Statistical analysis

The sample size for each group (kids or adults) and location of each measurement for CT or ECD did not warrant interpretation with tests such as the Kolmogorov-Smirnoff test. A parametric analysis is the best approach for studies with a low sample size, such as the one reported here.

Results were reported as median and IQR (ie, 25th to 75th percentiles). Comparisons between kids and adult goats for ECD, CT, MCA, pleomorphism, and polymegathism were performed by means of a Mann-Whitney U test. Generalized estimated equations models with a nonparametric approach by means of rank-transformation of dependent variables, with an unstructured matrix to account for intraeye correlation for location (central portion of the cornea and dorsal, medial, ventral, and temporal quadrants), were used to compare ECD and CT values among locations for both age groups. Analyses were performed with statistical software.^e Values of $P < 0.05$ were considered significant for all analyses.

Results

Although 38 eyes were initially collected for the study, only 27 (14 eyes from kids and 13 eyes from adult goats) were included for evaluation. Eleven eyes were excluded on the basis of results for slit-lamp examination because they had abnormalities including corneal edema (10 eyes) and transparent empty vessels (ghost vessels) (1 eye). None of the remaining eyes had any alteration of the corneal endothelium.

Median values were calculated for ECD, CT, MCA, pleomorphism, and polymegathism of kids and adult goats (**Table 1**). The ECD and percentage of hexagonal cells were significantly ($P < 0.001$) lower and CT and MCA were significantly ($P < 0.001$) higher for adult goats, compared with values for kids. There were no significant ($P = 0.933$) differences in polymegathism between kids and adult goats.

Median ECD (**Table 2**) and median CT (**Table 3**) were calculated for the various locations of the cornea of kids and adult goats. For kids, the ECD in the ventral quadrant

was significantly lower, compared with values for the cornea locations. For adult goats, the ECD in the dorsal and ventral quadrants was significantly lower, compared with values for the other locations. For both kids and adults, significant differences in CT were detected among locations (the dorsal quadrant of the cornea was the thickest, and the temporal quadrant was the thinnest).

Discussion

In the study reported here, CT and ECD were measured and corneal endothelial cells were characterized in the eyes of goats. To the authors' knowledge, this was the first report that provided a description of the features of the corneal endothelium and variations in those features attributable to age and location of the cornea in a large number of caprine eyes.

Endothelial cell density has been reported in several animal species, including humans.^{5-13,31-34} However, to the authors' knowledge, ECD of goats has not been reported. Nevertheless, the median values in the present study (3,831 cells/mm² in kids and 2,101 cells/mm² in adult goats) are extremely similar to values determined by means of specular microscopy in other ruminants such as sheep (3,532 cells/mm² in lambs and 2,204 cells/mm² in adult sheep),¹³ 4-year-old alpacas (2,275 cells/mm²) and 17-month-old llamas (2,669 cells/mm²).¹¹

Differences in ECD were detected among cornea locations. The ECD in the ventral quadrant in kids was significantly ($P < 0.001$) lower, compared with values for the central, medial, and temporal locations. The ECD in the dorsal and ventral quadrants of adult goats also were significantly lower, compared when values for the central, medial, and temporal locations. Significant differences in ECD among locations of the cornea have been reported for horses.¹⁰ In the present study, ECD of the ventral quadrant also was

significantly lower, compared with values for the medial and temporal quadrants. An increase of ECD in the peripheral regions of the cornea has also been described for humans.³⁵ However, such differences were not found in eyes of sheep¹³ or dogs.¹⁵ Moreover, other studies^{36,37} of humans failed to find differences among the quadrants. Variability of results among studies is difficult to explain. However, it could be attributable to differences in the methods used or even because photomicrographs were obtained at different distances from the limbus. Nevertheless, the methods used for ECD evaluation in eyes of sheep in another study¹³ and goats of the present study were exactly the same. It is possible species or genetics could affect ECD among cornea locations.

The CT in the central portion of the cornea of goats has been reported.^{29,30} In 1 study,²⁹ the CT in the central portion of the cornea for eyes of Saanen goats was determined by means of transcorneal ultrasonography. The mean CT in the central portion of the cornea of 6-month-old kids was 590 μm , which is similar to the CT of the central portion of the cornea detected in the present study for 1- to 4-month-old Murciano-Granadina kids (631 μm). Unfortunately, CT of the central portion of the cornea for adult goats cannot be compared because the maximum age of the Saanen goats was 18 months.²⁹ In another study,³⁰ CT was determined by means of optical coherence tomography. The mean CT in the central portion of the cornea of 6.4-year-old Alpine-Saanen crossbred goats was 611 μm , which is slightly less than the value obtained in the present study for adult goats (709 μm). However, the adult goats of the present study were older than the Alpine-Saanen crossbred goats evaluated in that other study.³⁰ It is also worth mentioning that a study¹³ of sheep found breed differences in CT, and a study³⁸ of humans found differences in CT on the basis of race.

In both kids and adult goats, the dorsal quadrant of the cornea was significantly ($P < 0.001$) thicker (646 and 751 μm , respectively) than the other locations, although the

central portion of the cornea of kid was also significantly ($P < 0.001$) thicker ($631 \mu\text{m}$) than the ventral and temporal quadrants. Conversely, the temporal quadrant was significantly thinner in both groups ($571 \mu\text{m}$ in kids and $672 \mu\text{m}$ in adult goats). Differences in CT among corneal locations have been reported for other animal species. For sheep, similar to results for goats, the dorsal and central locations of the cornea are significantly thicker than the other locations, whereas the temporal quadrant is the thinnest.¹³ For horses, dorsal and ventral locations of the cornea are significantly thicker, whereas the temporal and medial locations are significantly thinner than other locations of the cornea.¹⁰

The MCA in kids and adult goats was 255 and $466 \mu\text{m}^2$, respectively. These values are extremely similar to values for sheep ($283 \mu\text{m}^2$ in 3- to 6-month-old lambs and $473 \mu\text{m}^2$ in 2- to 5-year-old sheep).¹³ However, values obtained for goats are slightly higher than those reported in other mammals such as dogs ($393 \mu\text{m}^2$),³⁹ cats ($154 \mu\text{m}^2$ in kittens and $348 \mu\text{m}^2$ in adults),¹² and rabbits ($371 \mu\text{m}^2$).³⁹

Pleomorphism and polymegathism are terms related to corneal endothelial damage or age-related endothelial cell loss. If ECD decreases, the morphology of cells changes to fill the gaps left by dead cells, which means that the percentage of hexagonal cells decreases (ie, pleomorphism increases) and the size of cells also changes (polymegathism increases). The percentage of hexagonal cells in the physiologic corneal endothelium of humans is approximately 65%.⁴⁰ In the present study, the percentage of hexagonal cells in kids and adult goats was 80.53% and 67.76%, respectively. These results are extremely similar to values reported for sheep (75.64% in lambs and 69.9% in adults)¹³ and other mammals such as dogs (68%)⁴¹ and rabbits (71%).³⁹

The rate of polymegathism is represented by the coefficient of variation, which reflects differences in size among endothelial cells. The coefficient of variation in kids and adult goats was 19 and 21, respectively. Range of the coefficient of variation for eyes of humans is approximately 22 to 31 for young adults (mean, 27).³⁶ Results for the goats of the study reported here are similar to those of humans as well as those of sheep (18 in lambs and 18.1 in adults),¹³ dogs (22),⁴¹ rabbits (20),³⁹ and cats (19).¹²

Age-related changes in corneal endothelial cell morphology and ECD have been reported for humans,^{14,42-44} sheep,¹³ cats,¹² dogs,¹⁵ horses,¹⁰ and llamas and alpacas.¹¹ Endothelial cell loss of 0.56% cells/y has been reported for humans from 2 to 98 years of age.⁴³ For goats of the present study, ECD also decreased significantly ($P < 0.001$) with increasing age.

Concomitant with age-related cell loss, the remaining cells increase in size.^{14,42} An increase of MCA with increasing age has been reported in various animal species.^{12,13,15} In the present study, MCA in adult goats was significantly ($P < 0.001$) higher than in kids. Aging reduces the number of hexagonal cells (ie, pleomorphism increases) in humans⁴⁴ and other mammals.^{12,13,15} Similar to results of other studies, pleomorphism of goats of the present study also increased significantly ($P < 0.001$) with increasing age.

Controversy exists regarding the effects of increasing age on polymegathism. Some investigators report an increase in the coefficient of variation with increasing age of humans,^{45,46} whereas others have found no significant differences for the effects of age in humans,⁴⁷ dogs,¹⁵ cats,¹² and sheep.¹³ In the present study, age did not appear to affect polymegathism because there was no significant ($P = 0.933$) difference in the coefficient of variation between kids and adult goats. As mentioned previously, polymegathism is a term usually associated with endothelial damage.¹ Similarities of the coefficient of

variation between both groups can be explained because only healthy eyes were evaluated and we excluded (on the basis of results of ophthalmic examination or specular microscopy) all eyes that had any corneal alteration.

Finally, an increase of CT with increasing age has been reported in domestic mammals such as dogs,^{15,20} cats,⁴⁸ horses,²⁶ and sheep¹³ as well as humans.^{49,f} For goats of the present study, there was a significant ($P < 0.001$) increase of CT with increasing age. Although the mechanism for that increase is not totally clear, other age-related changes in the cornea (eg, deposition of material in Descemet's membrane or an increase in spacing of the intramolecular and interfibrillar collagen in the corneal stroma⁵⁰) could explain, at least in part, the increase in CT with increasing age.

For the study reported here, CT, ECD, and the size and shape of endothelial cells for goats were found to be extremely similar to those of other mammals and differ according to age, except for polymegathism. Because CT and ECD differ among corneal locations, the central portion of the cornea should not be considered as representative of the entire cornea in goats.

Acknowledgments

No third-party funding or support was received in connection with the study or publication of the manuscript.

The authors declare there were no conflicts of interest.

Presented as an abstract at the European College of Veterinary Ophthalmologists Annual Scientific Meeting, Estoril, Portugal, May 2017.

Footnotes

- a. Kowa SL-15 portable slit lamp biomicroscope, Kowa Co Ltd, Tokyo, Japan.
- b. Heine Omega 500 indirect ophthalmoscope, Heine, Herrsching, Germany.
- c. Specular microscope SP-2000P, Topcon, Tokyo, Japan.
- d. Adobe Photoshop CS6, Adobe Systems Inc, San Jose, CA.
- e. SPSS, version 20, IBM, Armonk, NY.
- f. Costantini E, Touzeau O, Gaujoux T, et al. Age-related changes in central and peripheral corneal thickness (abstr). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5107.

References

1. Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye* 1990;4:389–424.
2. Samuelson DA. Ophthalmic anatomy. In: Gelatt K, Gilger BC, Kern T, eds. *Veterinary ophthalmology*. 5th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2013;39–170.
3. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. *Arch Ophthalmol* 1979;97:1714–1719.
4. Abib FC, Barreto J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:1574–1578.
5. Stapleton S, Peiffer RL. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. *Am J Vet Res* 1979;40:1803–1804.
6. Sailstad DM, Peiffer RL. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Lab Anim* 1981;15:393–395.
7. Morita H, Shimomura K, Sakuma Y. Specular microscopy of corneal endothelial cells in cynomolgus monkeys. *J Vet Med Sci* 1994;56:763–764.
8. Morita H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. *J Vet Med Sci* 1995;57:273–277.
9. Morita H, Shimomura K. Specular microscopy of the corneal endothelial cells in common marmosets. *J Vet Med Sci* 1996;58:277–279.
10. Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG, et al. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *Am J Vet Res* 2001;62:479–482.
11. Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *Am J Vet*

Res 2002;63:326–329.

12. Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC, et al. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes.

Vet Ophthalmol 2010;13:222–226.

13. Coyo N, Peña MT, Costa D, et al. Effects of age and breed on corneal thickness, density, and morphology of corneal endothelial cells in enucleated sheep eyes. *Vet*

Ophthalmol 2016;19:367–372.

14. Laule A, Cable MK, Hoffman CE, et al. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol* 1978;96:2031-2035.

15. Gwin RM, Lerner I, Warren JK, et al. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

1982;22:267–271.

16. Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, et al. Postnatal development of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:44–51.

17. Von Sallmann L, Caravaggio LL, Grimes P. Studies on the corneal endothelium of the rabbit. I. Cell division and growth. *Am J Ophthalmol* 1961;51:955–969.

18. Martola EL, Baum JL. Central and peripheral corneal thickness: a clinical study.

Arch Ophthalmol 1968;79:28-30.

19. Henriksson JT, Bron AJ, Bergmanson JPG. An explanation for the central to peripheral thickness variation in the mouse cornea. *Clin Exp Ophthalmol* 2012;40:174–

181.

20. Gilger BC, Whitley RD, McLaughlin SA, et al. Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *Am J Vet Res* 1991;52:1570–1572.

21. Gilger BC, Wright JC, Whitley RD, et al. Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats. *Am J Vet Res* 1993;54:228–230.
22. Chan T, Payor S, Holden BA. Corneal thickness profiles in rabbits using an ultrasonic pachometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1408–1410.
23. Bayer J. Anatomie des Auges. In: *Tierärztliche Augenheilkunde*. Vienna, Austria: Wilhelm Braumüller, 1914;2–82.
24. Cafaro T, Ortiz S, Madonado C, et al. The cornea of guinea pig: structural and functional studies. *Vet Ophthalmol* 2009;12:234–241.
25. Inomata T, Mashaghi A, Hong J, et al. Scaling and maintenance of corneal thickness during aging. *PLoS One* 2017;12:e0185694.
26. Herbig L, Eule J. Central corneal thickness measurements and ultrasonographic study of the growing equine eye. *Vet Ophthalmol* 2015;18:462–471.
27. Bapodra P, Bouts T, Mahoney P, et al. Ultrasonographic anatomy of the Asian elephant (*Elephas maximus*) eye. *J Zoo Wildl Med* 2010;41:409–417.
28. Lynch G, Hoffman A, Blocker T. Central corneal thickness in koi fish: effects of age, sex, body length, and corneal diameter. *Vet Ophthalmol* 2007;10:211–215.
29. Ribeiro AP, Silva ML, Rosa JP, et al. Ultrasonographic and echobiometric findings in the eyes of Saanen goats of different ages. *Vet Ophthalmol* 2009;12:313–317.
30. LoPinto AJ, Pirie CG, Bedenice D, et al. Corneal thickness of eyes of healthy goats, sheep, and alpacas manually measured by use of a portable spectral-domain optical coherence tomography device. *Am J Vet Res* 2017;78:80–84.
31. Pigatto JAT, Laus JL, Santos JM, et al. Corneal endothelium of the Magellanic

penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J Zoo Wildl Med* 2005;36:702–705.

32. Pigatto JAT, Franzen AA, Pereira FQ, et al. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Cienc Rural* 2009;39:926–929.

33. Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artoni SM, Laus JL, et al. Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Cienc Rural* 2009;39:117–122.

34. Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, et al. Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. *Curr Eye Res* 2010;35:1072–1080.

35. Amann J, Holley GP, Lee S-B, et al. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol* 2003;135:584–590.

36. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, et al. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985;4:671–678.

37. Blackwell WL, Gravenstein N, Kaufman HE. Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. *Am J Ophthalmol* 1977;84:473–476.

38. La Rosa FA, Gross RL, Orengo-Nania S. Central corneal thickness of Caucasians and African Americans in glaucomatous and nonglaucomatous populations. *Arch Ophthalmol* 2001;119:23-27.

39. Yee RW, Edelhauser HF, Stern ME. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Exp Eye Res* 1987;44:703–714.

40. Doughty MJ. Prevalence of “non-hexagonal” cells in the corneal endothelium of

young Caucasian adults, and their inter-relationships. *Ophthalmic Physiol Opt* 1998;18:415–422.

41. Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD, et al. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesqui Vet Bras* 2008;28:427–430.

42. Blatt HL, Rao GN, Aquavella JV. Endothelial cell density in relation to morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:856–859.

43. Murphy C, Alvarado J, Juster R, et al. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:312–322.

44. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:779–782.

45. Padilla MDB, Sibayan SAB, Gonzales CSA. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Filipino eyes. *Cornea* 2004;23:129–135.

46. Sheng H, Bullimore MA. Factors affecting corneal endothelial morphology. *Cornea* 2007;26:520–525.

47. Galgauskas S, Norvydaitė D, Krasauskaitė D, et al. Age-related changes in corneal thickness and endothelial characteristics. *Clin Interv Aging* 2013;8:1445–1450.

48. Moodie KL, Hashizume N, Houston DL, et al. Postnatal development of corneal curvature and thickness in the cat. *Vet Ophthalmol* 2001;4:267–272.

49. Haider KM, Mickler C, Oliver D, et al. Age and racial variation in central corneal thickness of preschool and school-aged children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2008;45:227–233.

50. Faragher RG, Mulholland B, Tuft SJ, et al. Aging and the cornea. *Br J Ophthalmol* 1997;81:814–817.

Figures and Tables

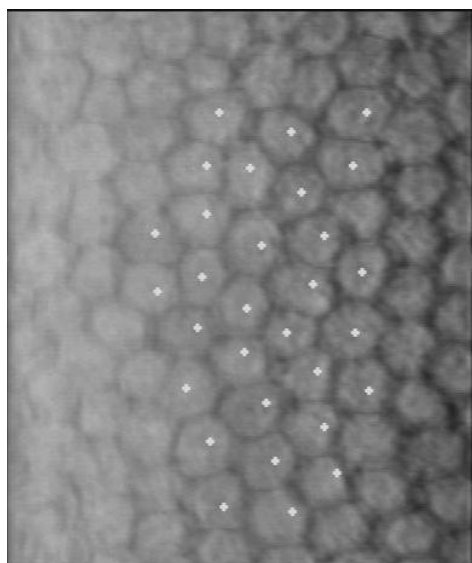


Figure 1—Photomicrograph of endothelial cells from the central portion of the cornea of a 9-year-old goat. Thirty well-defined corneal endothelial cells were selected (white crosses) and evaluated to determine morphological variables. For the 30 cells of this image, the mean \pm SD MCA is $555 \pm 76 \mu\text{m}^2$ (minimum cell area, $314 \mu\text{m}^2$; maximum cell area, $633 \mu\text{m}^2$), polymegathism (measured as the coefficient of variation of cell area) is 13, and ECD is $1,800 \text{ cells}/\text{mm}^2$.

Table 1—Values for morphological variables for 30 cells evaluated in the cornea of 14 eyes obtained from kids (1 to 4 months of age) and 13 eyes obtained from adult goats (7 to 10 years of age).

Variable	Kids			Adults			P value*
	Median	IQR	Range	Median	IQR	Range	
ECD (cells/mm ²)	3,831	3,669–4,011	3,466–4,391	2,101	1,966–2,251	1,669–2,557	< 0.001
CT (μm)	608	573–655	498–750	706	670–730	60–795	< 0.001
MCA (μm^2)	255	243–272	227–282	466	425–507	416–562	< 0.001
Pleomorphism (%)	80.53	78.83–83.30	69.96–86.63	67.76	65.50–69.96	56.60–4.40	< 0.001
Polymegathism (%)	19	18–22	14–33	21	15–26	12–32	0.933

Pleomorphism was the percentage of hexagonal cells. Polymegathism was measured as the coefficient of variation of cell area.

*Values were significant at $P < 0.05$.

Table 2—Values for ECD (cells/mm²) by corneal location (central portion of the cornea and each of 4 peripheral quadrants) for 14 eyes obtained from kids and 13 eyes obtained from adult goats.

Location	Kids			Adults		
	Median	IQR	Range	Median	IQR	Range
Central	3,920	3,675–4,113	3,562–4,391	2,143	1,968–2,350	1,779–2,404
Dorsal	3,811	3,623–3,966	3,575–4,324	2,039*	1,945–2,101	1,669–2,338
Medial	3,907†	3,804–4,032	3,631–4,215	2,135†	2,090–2,276	1,808–2,557
Ventral	3,742*‡	3,556–3,851	3,499–4,143	1,992‡	1,947–2,198	1,840–2,373
Temporal	3,953§	3,668–4,051	3,466–4,207	2,107†	2,067–2,247	1,857–2,510

*Within an age group, value differs significantly ($P < 0.05$) from the value for the central location. †Within an age group, value differs significantly ($P < 0.05$) from the value for the dorsal location. ‡Within an age group, value differs significantly ($P < 0.05$) from the value for the medial location. §Within an age group, value differs significantly ($P < 0.05$) from the value for the ventral location.

See Table 1 for remainder of key.

Table 3—Values for CT(μm) by corneal location for 14 eyes obtained from kids and 13 eyes obtained from adult goats.

Location	Kids			Adults		
	Median	IQR	Range	Median	IQR	Range
Central	631	618–668	550–750	709	675–721	625–763
Dorsal	646	596–680	572–740	751*	743–776	664–795
Medial	597†	561–624	498–669	685†	674–715	611–747
Ventral	598*†	573–614	522–692	711†	662–721	605–734
Temporal	571*†‡§	545–598	531–674	672*†‡	633–703	601–740

See Tables 1 and 2 for key.

Estudio 3

DOI: 10.1111/vop.12578

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Endothelial cell density and characterization of corneal endothelial cells in the Tawny Owl (*Strix aluco*) using specular microscopy

Natàlia Coyo¹ | Marta Leiva^{1,2} | Daniel Costa² | Rafael Molina³ | Olga Nicolás⁴ | Jose Ríos^{5,6} | Maria Teresa Peña^{1,2}

¹Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

²Servei d'Oftalmologia, Fundació Hospital Clínic Veterinari, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

³Centre de Recuperació de Fauna Salvatge de Torreferrussa, Catalan Wildlife Service – Forestal Catalana, SA (Generalitat de Catalunya), Barcelona, Spain

⁴Centre de Recuperació de Fauna de Valldaleu, Generalitat de Catalunya, Lleida, Spain

⁵Medical Statistics Core Facility, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁶Biostatistics Unit, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Correspondence

M. Leiva
Email: marta.leiva@uab.cat

Abstract

Objective: To determine endothelial cell density (ECD) and morphology and morphometry of corneal endothelial cells in the tawny owl (*Strix aluco*), as well as to report the effects of aging on these parameters.

Animal study and procedures: Twenty tawny owls were included in the study and classified into 2 groups according to their age: fledglings (<1 year old) and adults (>1 year old). Central corneal endothelium was studied by means of non-contact specular microscopy (Specular Microscope SP-2000P; Topcon, Tokyo, Japan), and results for ECD (cells/mm²), mean cell area (MCA (μm²)), polymegathism (CV), and pleomorphism (% hexagonal cells) were obtained. Results are described by median, interquartile range (25th, 75th percentiles), and absolute range for ECD, MCA, pleomorphism, and polymegathism. In addition, inferential analyses by Mann-Whitney U test were also performed. A two-tailed Type I error of 5% was established.

Results: Results in fledglings were as follows: ECD = 2864 cells/mm², MCA = 348 μm², % hexagonal cells = 72.75%, and CV = 21. Results in adults were as follows: ECD = 2602 cells/mm², MCA = 384 μm², % hexagonal cells = 78.83%, and CV = 16. No significant differences in ECD and MCA were seen between the groups ($P > .05$), although there were significant differences in % hexagonal cells and CV ($P < .05$).

Conclusions: Tawny owls present a uniform endothelium in cell size and shape, although ECD and MCA differ greatly from other bird species. Differences in ECD and MCA could not be found between fledglings and adults probably because of the youth of adult specimens, although there were differences in pleomorphism and polymegathism.

KEYWORDS

bird, cornea, endothelium, pleomorphism, raptor, specular microscopy

1 | INTRODUCTION

Birds of prey, also known as raptors (from the Latin word *rapere*, meaning to seize or plunder), hunt and feed on other animals, especially higher vertebrates. Vision is the most important sense for such species, because good eyesight is essential for safe flight and hunting. In fact, visual deficits can result in a decrease in food intake and reluctance to fly.¹ Vision impairment can be related to multiple ocular and extraocular causes, corneal lesions being one of the most frequently encountered diagnoses during the ophthalmic examination of birds of prey.¹⁻⁴

The avian cornea is composed of five different layers that, from anterior to posterior, are as follows: the corneal epithelium, the Bowman's layer, the corneal stroma, the Descemet's membrane, and the corneal endothelium.¹ The latter is a single layer of polygonal cells that covers the posterior surface of the cornea and faces the anterior chamber formed between the cornea and the iris. The corneal endothelium prevents the aqueous humor to flow from the anterior chamber to the corneal stroma and, consequently, maintains the cornea in the slightly dehydrated state that is required for optical transparency. A minimum density of endothelial cells is necessary to ensure proper function of the endothelium. Disturbance of this critical density may result in loss of corneal transparency.⁵

Noncontact specular microscopy is one of the most accurate noninvasive techniques for visualizing and analyzing the corneal endothelium in vivo. Morphologic and morphometric endothelial studies of the healthy eye have been performed in humans⁶ and in other several mammal species, including dogs,⁷ rabbits,^{8,9} llamas,¹⁰ alpacas,¹⁰ horses,¹¹ cynomolgus monkeys,¹² common marmosets,¹³ cats,¹⁴ sheep,¹⁵ and chinchillas,¹⁶ using specular microscopy. Moreover, confocal microscopy has been used to visualize the corneal endothelium of mice and rats¹⁷ and different bird species,¹⁸ although endothelial parameters were not analyzed in this study. Finally, changes due to the age of endothelial cell density, cell morphology, and morphometry have been reported in humans,^{6,19} dogs,^{20,21} cats,¹⁴ pigs,²¹ cows,²¹ rabbits,^{8,22} and sheep.¹⁵

Regarding the avian corneal endothelium, very few studies have been published. Endothelial features have been studied by means of scanning electron microscopy (SEM) in ostriches,^{23,24} penguins,²⁵ an emu, a barred owl, and an Australian galah;²³ and by means of specular microscopy in a goose.²⁶ The effect of age on corneal endothelium has also been studied in chicken.²⁷ To the best of the authors' knowledge, no morphologic nor morphometric studies of the healthy endothelium have been carried out on quite a significant number of birds of prey. Furthermore, there are

no research studies on the effect of aging on the corneal endothelium in such avian species.

The purpose of this study was two fold. Firstly, to determine and describe corneal endothelial cell morphology and morphometry in tawny owls (*Strix aluco*) using specular microscopy and secondly to report the effect of aging on these corneal parameters.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

Twenty tawny owls (*Strix aluco*) admitted to the Wildlife Rehabilitation Centers of Torreferrussa and Vallcalent for reasons nonrelated to this study were included. Animals were classified into two groups according to age: fledglings (less than one year old; n = 10) and adults (more than one year old; n = 10) (Figure 1). Gender was not determined. All animals were deemed free of any systemic problems or previous ocular history.

2.2 | Ophthalmologic examination

In all the birds, a complete and bilateral ophthalmic examination was carried out in two stages. The first stage, performed before the specular microscopy, included an assessment of palpebral, dazzle, and direct pupillary light reflex, diffuse and slit-lamp biomicroscopy (Kowa SL-15 Portable Slit-Lamp Biomicroscope; Kowa Co. Ltd, Tokyo, Japan), rebound tonometry (Tonovet; Tiolat Oy, Helsinki, Finland), and indirect ophthalmoscopy (Heine Omega 500, Heine, Herrsching, Germany). The second stage, performed immediately after the specular microscopy, consisted of the fluorescein test. Animals presenting ocular abnormalities in any of the stages were excluded from the study.

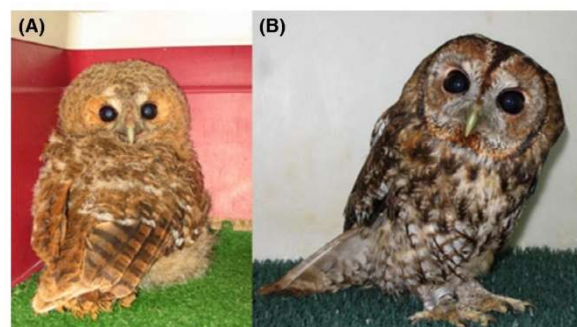


FIGURE 1 Images of two tawny owls included in the study (*Strix aluco*). A, Fledgling showing mostly feathered appearance still with some wispy down on feathers on the top of the head. B, Adult tawny owl showing definitive feathers and mature appearance

2.3 | Density of corneal endothelial cells, pleomorphism, and polymegathism

Immediately after the first stage of the ophthalmic examination, specular microscopy was performed in a randomly selected eye for each tawny owl (www.random.org), using a noncontact specular microscope (Specular Microscope SP-2000P; Topcon, Tokyo, Japan) in manual mode. The experiment was conducted in a quiet environment, with minimal head restraint while an experienced assistant gently held the animal in a vertical position and at a working distance of 25 mm. The same investigator performed all analyses (NC).

Three different micrographs of the central cornea were taken to evaluate the endothelial cell density (expressed as cells/mm²). Thirty well-defined cells were closely evaluated from each micrograph for morphological parameters (Figure 2); mean cell area (μm²), polymegathism (measured by the coefficient of variation of cell area), and pleomorphism (measured by the percentage of cells that were hexagonal, ie, had 6 sides). Pleomorphism was analyzed by means of imaging software (Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems Inc, USA).

2.4 | Statistical analysis

Results are described by median, interquartile range (25th, 75th percentiles), and absolute range for ECD, MCA, pleomorphism, and polymegathism. Inferential analyses were performed by Mann-Whitney U test, and a two-tailed Type I error of 5% was established. Due to the exploratory characteristics of this study, a strategy for multiplicity adjustment was not planned, thus significant results should be validated in posterior independent studies. All statistical calculations were executed on SPSS v.20.0 (SPSS™, IBM Corporation, New York, NY, USA).

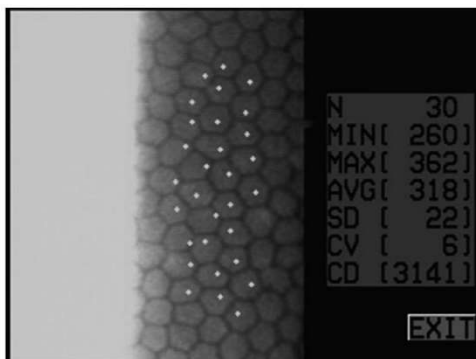


FIGURE 2 Selection of thirty well-defined cells of a central corneal endothelium frame of an adult tawny owl

3 | RESULTS

Median ECD, MCA, pleomorphism, and polymegathism obtained values are shown in Table 1. The evaluated parameters did not differ significantly between the left and right eyes or between fledglings and adults, except for differences in pleomorphism and polymegathism between the two age groups ($P < .05$) (Figure 3).

4 | DISCUSSION

The present study describes endothelial cell density and characterizes corneal endothelial cells in the tawny owl. To the author's knowledge, this is the first description of these parameters and their variations according to age in *Strix aluco*.

Although there have been no previous studies carried out on a significant number of eyes on the corneal endothelium of raptors, there are some studies reporting endothelial parameters in other bird species.²³⁻²⁷ The values obtained for ECD in the tawny owl in the present study (2864 cells/mm² in fledglings and 2602 cells/mm² in adults) are very similar to those described in the goose (2410 cells/mm²),²⁶ but significantly lower than the ones published for the Magellanic penguin (3717 cells/mm²),²⁵ the ostrich (3717 cells/mm²),²⁴ the chicken (6424 cells/mm²),²⁷ the barred owl (4713 cells/mm²), the South African ostrich (9250 cells/mm²), the Australian galah (9905 cells/mm²), and the emu (11 734 cells/mm²).²³ It is well known that a correlation exists between corneal endothelial morphology, vertebrate phylogeny, and their respective functional and structural capacity,²⁶ so endothelial cell density is expected to be different among animal species. In addition, the different activity patterns of birds—strictly nocturnal, strictly diurnal, or intermediate pattern (crepuscular)—have also been associated with differences in eye morphology and retinal organization.²⁸

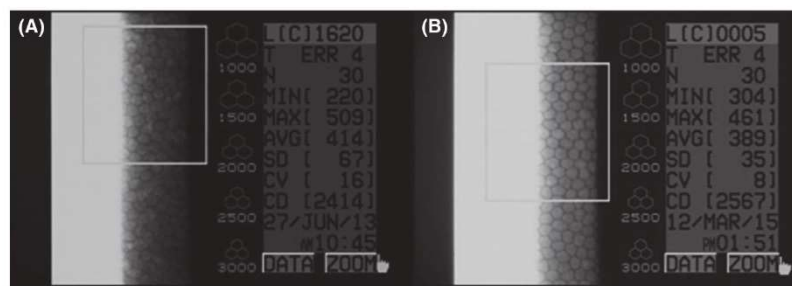
From the above-mentioned bird species, the barred owl is the only one that belongs to the same order as the tawny owl, the Strigiformes.²⁹ However, despite belonging to the same taxonomical category and both species being historically described as nocturnal birds, there are significant differences in the ECD. These discrepancies could be due to the fact that some authors describe tawny owls as crepuscular³⁰ and not strictly nocturnal, or to the different geographical distribution of both owls; the barred owl is most commonly seen in North America, while the tawny owl can be located in Europe and western Asia.³¹ Moreover, the differences seen in ECD could be also due to the different imaging methods used in the studies (scanning electron microscopy in the barred owl²³ vs specular microscopy in the tawny owl). Finally, it is worth pointing out that in Dr

TABLE 1 Endothelial cell density (ECD, cells/mm²), mean cell area (MCA, μm²), pleomorphism (% of hexagonal cells), and polymegathism (CV) according to age in *Strix aluco*

	Fledglings (<1 y old)	Adults (>1 y old)	P-value
ECD	2864 [2614; 2991] 2547-3266	2602 [2483; 2927] 2034-3176	.197
MCA	348 [334; 383] 306-392	384 [343; 402] 315-493	.165
Pleomorphism	72.75 [68.83; 74.43] 62.21-88.86	78.83 [75.53; 82.16] 71.74-86.63	.041*
Polymegathism	21 [19; 22] 19-24	16 [10; 21] 8-35	.045*

Results are given as median [percentiles 25th, 75th] and absolute range.

*Statistically significant differences ($P < .05$).

**FIGURE 3** Microphotographs of the central corneal endothelium of a young tawny owl (A) and an adult tawny owl (B)

Collin's study, only one barred owl was studied and it was scientifically named as *Bubo strix*, although its scientific name is *Strix varia*.³² Thus, authors of the present study are not sure about which species was evaluated, if it was the barred owl (*Strix varia*) or the Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*, from specific name *Strix bubo* Linnaeus).

Regarding mean cell area, results obtained for the tawny owl (348 μm² in fledglings and 384 μm² in adult) are higher than those previously reported for the ostrich (269 μm²),²⁴ the Magellanic penguin (269 μm²),²⁵ and the chicken (166 μm²).²⁷ In healthy eyes, the surface of the corneal endothelium must be completely covered by cells, so if the endothelial cell density in the tawny owl is lower than in other bird species, the cell size should ideally be bigger.

Pleomorphism and polymegathism are two terms directly related to endothelial cell loss. Corneal endothelium presents a limited regenerative capacity in the majority of animal species, so if endothelial density decreases whatever the cause is, remaining cells will enlarge to cover affected areas. Therefore, in this situation, endothelial cells will lose their hexagonal appearance (pleomorphism) and their original size (polymegathism).⁵ In the herein, tawny owls showed a uniform hexagonal pattern (72.75% and 78.83% of hexagonal cells in young and adult birds, respectively), similar to the chicken (64%),²⁷ the ostrich

(75%),²⁴ the goose (79%),²⁶ and the Magellanic penguin (80%).²⁵

In the present study, the coefficient of variation was 21 for young birds and 16 for adults, which differs greatly from those ones reported for the Magellanic penguin (0.08)²⁵ and the ostrich (0.06).²⁴ Based on the differences seen in the coefficient of variation when two different non-contact specular microscopes are used,³³ differences seen between species could be due to the different imaging methods used in each study. It is also worth pointing out that some of the studies above mentioned²³⁻²⁵ were performed with scanning electron microscopy, and it has been reported that changes in endothelial cell dimensions occur as a result of processing the tissue.³⁴ Therefore, comparisons regarding cell's morphology and morphometry among different studies using specular microscopy and scanning electron microscopy must be carried out cautiously.

The effect of aging on corneal endothelium has been previously described in human beings, in which an annual reduction of 0.52% in cell density has been seen from the age of 20.³⁵ Concurrently, mean cell area and pleomorphism increase with age.⁵ These changes have also been detected in other mammals^{14,15,20,36} and birds.²⁷ Surprisingly, the present study did not show statistically significant differences in ECD and MCA between fledglings and adults. However, considering absolute numbers, a slight

decrease in ECD associated with an increase in MCA was observed. One could hypothesize that, as it occurs in other species such as the rabbit, those findings could be the result of some mitotic regeneration. Surprisingly, endothelial cell density also decreases with age in rabbits^{9,36} which makes this hypothesis unlikely. In the authors' opinion, the similarities between the two groups could be due to the proximity in age between them. Unfortunately, tawny owls do not show morphologic differences to objectively establish the age of the individuals, just allowing differentiating between fledglings and adults. It has been reported that the average life expectancy of the tawny owl in the wild is approximately 5 years,³⁷ so it is probable that significant differences regarding ECD and MCA between groups were not detected because adults were relatively young specimens.

With aging, a decrease in the percentage of hexagonal cells (which means an increase in pleomorphism) and an increase in polymegathism are expected.⁵ Surprisingly, in the present study, fledglings showed higher values of pleomorphism and polymegathism when compared to adults. This observation has been reported previously in very young canines (1-4 weeks of age), kittens, and rabbits.^{38,39} Although the reason for these findings is unknown, some authors have suggested that it could be due to increased mitotic activity in very young animals with concomitant rapid corneal growth.⁴⁰ Therefore, slight mitotic activity of the endothelial cells in the fledglings of the present study could explain why pleomorphism and polymegathism values were higher in the fledglings group.

In conclusion, corneal endothelium of the tawny owl has a cellular density of 2602-2864 cells/mm², cells mainly being hexagonal in shape. In addition, the size of the endothelial cells seems to be bigger (348-384 μm²) than in other avian species. Aging does not seem to affect cell density or mean cell area in *Strix aluco*, although further studies with older individuals should be performed to further characterize the aging of the endothelial cells. Differences in pleomorphism and polymegathism between fledglings and adults suggest slight mitotic activity in very young specimens. The present morphologic and morphometric corneal endothelial study adds important information for the understanding of corneal endothelial disease behavior in the *Strix aluco*.

REFERENCES

- Murphy C. Raptor ophthalmology. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1987;9:241-260.
- Cousquer G. Ophthalmological findings in free-living tawny owls (*Strix aluco*) examined at a wildlife veterinary hospital. *Vet Rec*. 2005;156:734-739.
- Williams DL, Gonzalez Villavincencio CM, Wilson S. Chronic ocular lesions in tawny owls (*Strix aluco*) injured by road traffic. *Vet Rec*. 2006;159:148-153.
- Harris MC, Schorling JJ, Herring IP, Elvinger F, Bright PR, Pickett JP. Ophthalmic examination findings in a colony of Screech owls (*Megascops asio*). *Vet Ophthalmol*. 2008;11:186-192.
- Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye (Lond)*. 1990;4:389-424.
- Abib FC, Barreto J. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *J Cataract Refract Surg*. 2001;27:1574-1578.
- Stapleton S, Peiffer RL Jr. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. *Am J Vet Res*. 1979;40:1803-1804.
- Sailstad DM, Peiffer RL. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Lab Anim*. 1981;15:393-395.
- Morita H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. *J Vet Med Sci*. 1995;57:273-277.
- Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *Am J Vet Res*. 2002;63:326-329.
- Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG, Brooks DE. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanized horses. *Am J Vet Res*. 2001;62:479-482.
- Morita H, Shimomura K, Sakuma Y. Specular microscopy of corneal endothelial cells in cynomolgus monkeys. *J Vet Med Sci*. 1994;56:763-764.
- Morita H, Shimomura K. Specular microscopy of the corneal endothelial cells in common marmosets. *J Vet Med Sci*. 1996;58:277-279.
- 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;13:222-226.
- 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*. 2016;19:367-372.
- 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*. 2015;18(Suppl 1):137-142.
- Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, et al. Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. *Curr Eye Res*. 2010;35:1072-1080.
- Kafamik C, Fritsche J, Reese S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Vet Ophthalmol*. 2007;10:222-230.
- Laule A, Cable MK, Hoffman CE, Hanna C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol*. 1978;96:2031-2035.
- Gwin RM, Lerner I, Warren JK, Gum G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1982;22:267-271.
- Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, et al. Postnatal development of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986;27:44-51.
- Von Sallmann L, Caravaggio LL, Grimes P. Studies on the corneal endothelium of the rabbit. I. Cell division and growth. *Am J Ophthalmol*. 1961;51:955-969.
- Collin SP, Collin HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clin Exp Optom*. 1998;81:245-254.

24. Pigatto JAT, Franzen AA, Pereira FQ, et al. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciênc Rural*. 2009;39:926-929.
25. Pigatto JAT, Laus JL, Santos JM, et al. Corneal endothelium of the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J Zoo Wildl Med*. 2005;36:702-705.
26. Yee RW, Edelhauser HF, Stern ME. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Exp Eye Res*. 1987;44:703-714.
27. Albuquerque L, Pigatto JAT, da-Freitas LVRP. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. *Semin Ciênc Agrar*. 2015; 36: 4199-4206.
28. Gutiérrez-Ibáñez C, Iwaniuk AN, Lisney TJ, Wylie DR. Comparative study of visual pathways in owls (Aves: Strigiformes). *Brain Behav Evol*. 2013;81:27-39.
29. Jarvis ED, Mirarab S, Aberer AJ, et al. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*. 2014;346:1320-1331.
30. Sunde P, Bølstad MS, Desfor KB. Diurnal exposure as a risk sensitive behaviour in tawny owls *Strix aluco*? *J Avian Biol*. 2003;34:409-418.
31. Gutiérrez RJ, Cody M, Courtney S, Franklin AB. The invasion of barred owls and its potential effect on the spotted owl: a conservation conundrum. *Biol Invasions*. 2007;9:181-196.
32. Jobling JA. *The Helm Dictionary of Scientific Bird Names: From Aalge to Zusii*. New Edition (ed. Redman N, Martin J). Christopher Helm London: London, 2010;79.
33. Gasser L, Reinhard T, Böhringer D. Comparison of corneal endothelial cell measurements by two non-contact specular microscopes. *BMC Ophthalmol*. 2015;15:87.
34. Schutten W, Van Horn D. Corneal endothelial cell shrinkage after critical point drying. *Ann Ophthalmol*. 1980;12:1165-1167.
35. Murphy C, Alvarado J, Juster R, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25:312-322.
36. Doughty MJ. The cornea and corneal endothelium in the aged rabbit. *Optom Vis Sci*. 1994;71:809-818.
37. Martin G. Regularly Nocturnal Birds. In: Poyser A, ed. *Birds by Night*, 1st edn. London: A&C Black Publishers; 1990:103-133.
38. MacCallum DK, Bahn CF, Lillie JH, Meyer RF, Martonyi CL. Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983;24:247-250.
39. Samuelson DA. Ophthalmic anatomy. In: Gelatt KN, ed. *Veterinary Ophthalmology*, 5th edn. Iowa: Wiley-Blackwell; 2013:39-170.
40. Laing RA, Sanstrom MM, Berrospi AR, Leibowitz HM. Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res*. 1976;22:587-594.

How to cite this article: Coyo N, Leiva M, Costa D, et al. Endothelial cell density and characterization of corneal endothelial cells in the Tawny Owl (*Strix aluco*) using specular microscopy. *Vet Ophthalmol*. 2018;00:1–6. <https://doi.org/10.1111/vop.12578>

Estudio 4

Veterinary Ophthalmology



EFFECT OF SKULL CONFORMATION ON CORNEAL THICKNESS, ENDOTHELIAL CELL DENSITY AND MORPHOLOGY IN HEALTHY DOGS

Journal:	<i>Veterinary Ophthalmology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Coyo, Natàlia; Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Medicina i Cirurgia Animals Leiva, Marta; Hospital Clínic Veterinari, Servei d'Oftalmologia; Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Medicina i Cirurgia Animals Ríos, Jose; Biostatistics and Data Management Core Facility; Universitat Autònoma de Barcelona, Laboratory of Biostatistics & Epidemiology Peña Gimenez, Maria Teresa; Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Medicina i Cirurgia Animals; Hospital Clínic Veterinari, Servei d'Oftalmologia
Keywords:	cornea, endothelium, canine, brachycephalic, dolichocephalic, mesaticephalic

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **1 EFFECT OF SKULL CONFORMATION ON CORNEAL THICKNESS,**
4
5 **2 ENDOTHELIAL CELL DENSITY AND MORPHOLOGY IN HEALTHY DOGS**
6

7
8
9 **4 AUTHORS:** Coyo N, Leiva M, Ríos J, Peña MT
10

11 **5 AFFILIATIONS**
12

13 **6 Natalia Coyo, DVM, MSc.** Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de
14
15 Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.
16

17 **8 Marta Leiva, DVM, PhD, DipECVO.** Servei d'Oftalmologia de la Fundació Hospital
18
19 Clínic Veterinari, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. Departament
20
21 de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de
22
23 Barcelona, Spain.
24

25 **12 Teresa Peña, DVM, PhD, DipECVO.** Departament de Medicina i Cirurgia Animals,
26
27 Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. Servei
28
29 d'Oftalmologia de la Fundació Hospital Clínic Veterinari, Universitat Autònoma de
30
31 Barcelona, Bellaterra, Spain
32

33 **16 José Ríos, MSc.** Biostatistics and Data Management Core Facility, IDIBAPS - Hospital
34
35 Clínic, Laboratory of Biostatistics & Epidemiology, Universitat Autònoma de
36
37 Barcelona, Bellaterra, Spain.
38

39 **19 Address communications to:** Dr. Marta Leiva
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

20 Servei d'Oftalmologia de la Fundació Hospital Clínic Veterinari, Universitat Autònoma
21 de Barcelona, Bellaterra, Spain. Tel +34 93 5811387 Fax: +34.93 5813428
22 e-mail: marta.leiva@uab.cat
23

24 **Running title:** Effects of canine skull conformation on corneal parameters
25

ABSTRACT

Objective: The purpose of the study was to determine whether endothelial cell density (ECD), morphology and morphometry of corneal endothelial cells and corneal thickness (CT) vary depending on skull conformation in dogs [measured by the skull index (SI)].

Animals studied: Forty-two healthy dogs of different breeds, ranging from 2 to 7 years were classified into three groups depending on their SI: dolichocephalic (SI<50), mesaticephalic (SI between 50-60) and brachycephalic (SI>60).

Procedure: Endothelial cell density (ECD; cells/mm²), mean cell area (MCA; μm²), pleomorphism (% of hexagonal cells), polymegathism (CV) and corneal thickness (CT, μm) were evaluated in the central cornea by means of non-contact specular microscopy. Results are shown by median, interquartile range (25th, 75th percentiles) and absolute range. A non-parametrical approach by means of an ANOVA analysis, by rank transformation of independent variables was used.

Results: Results in the brachycephalic (n=15), mesaticephalic (n=16) and dolichocephalic (n=11) groups were as follows: ECD=2533cells/mm², MCA=394μm², % hexagonal cells=80%, CV=26 and CT=562μm; ECD=2485cells/mm², MCA=403μm², % hexagonal cells=75.5% and CV=25, CT=572μm; and ECD=2614cells/mm², MCA=387μm², % hexagonal cells=80%, CV=24 and CT=621μm, respectively. There were no statistically significant differences (p>0.05) in any of the parameters studied among the three groups.

Conclusions: Skull conformation in dogs does not seem to affect corneal endothelial parameters or CT. This information could be useful when facing corneal endothelial diseases in dogs, as well as when selecting donor corneas for fresh keratoplasties.

Keywords: cornea, endothelium, canine, brachycephalic, dolichocephalic, mesaticephalic

1
2
3 51 **INTRODUCTION**

4
5 52 More than 400 breeds of dogs (*Canis familiaris*) exist worldwide and the morphological
6
7 53 variation among these breeds is so diverse and readily discernible that, for many, skull
8
9 54 shape is breed-defining. In fact, the dog is considered nowadays as the mammal species
10
11 55 with the greatest cranial diversity. ^(1,2)

12
13 56 Throughout history, craniofacial classification has mainly been done by two methods.

14
15 57 The traditional phenotypic assignment into brachycephalic (short, wide-headed),

16
17 58 mesaticephalic (head of medium proportions) and dolichocephalic (long, narrow-

18
19 59 headed) is based on the assumption, that dogs of a specific breed have more or less

20
21 60 uniform skull shapes. However, alterations due to breeding and differences between

22
23 61 individual dogs of the same breed must lead to modifications. ⁽³⁾ Therefore, and for a

24
25 62 subtler classification, craniofacial measurements were introduced. ^(1,4,5) There are three

26
27 63 main measurements in craniology: the skull index, the cranial index and the facial index

28
29 64 (Fig. 1). ⁽¹⁾ The skull index (SI) is one of the most accepted methods to determine skull

30
31 65 morphology and is obtained by multiplying the skull width (widest interzygomatic

32
33 66 distance) by 100, and then dividing the product by the skull length (from inion to

34
35 67 prosthion). Facial and cranial indexes are computed in the same manner, although facial

36
37 68 index considers only the facial length and the facial width, while cranial index takes into

38
39 69 account the cranial length and the cranial width. Historically, SI has allowed objective

40
41 70 assignment of dogs into the three already mentioned craniofacial categories. ⁽¹⁾ More

42
43 71 recently, two different radiological indexes have been also described. ^(3,5)

44
45 72 Canine skull conformation has been previously associated with variations in behavior,

46
47 73 ⁽⁶⁾ in the size and the angle of the olfactory bulb, ^(7,8) and in the distribution of retinal

48
49 74 ganglion cells. ⁽⁹⁾ In addition, brachycephalic dogs are prone to difficult, obstructive

50
51 75 breathing because of a combination of elongated soft palate, stenotic nares and everted

1
2
3 76 laryngeal sacculles (brachycephalic syndrome). Brachycephalic skull conformation has
4
5 77 been also associated with multiple ocular surface and adnexa variations, such as
6
7 78 euryblepharon, wide but superficial orbits,⁽¹⁰⁾ reduced corneal sensitivity,^(11,12) lacrimal
8
9 79 deficiencies,⁽¹³⁾ medial canthal entropion and trichiasis,⁽¹⁴⁾ predisposing brachycephalic
10
11 80 dogs to pigmentary keratitis,⁽¹⁰⁾ complicated corneal ulcers^(15,16) and more severe reflex
12
13 81 anterior uveitis.⁽¹⁷⁾

14
15
16 82 In human ophthalmology, several studies report significant differences in corneal
17
18 83 thickness (CT), endothelial cell density (ECD) and morphometry depending on the race
19
20 84 or the population studied.⁽¹⁸⁻²⁰⁾ Similarly, the morphological characteristics of the
21
22 85 corneal endothelium, as well as CT, have been also greatly described in the dog,⁽²¹⁻²³⁾
23
24 86 but to the authors' knowledge there are no studies evaluating the effects of the skull
25
26 87 conformation on these parameters.

27
28
29 88 The purpose of the present study was to determine whether skull conformation has any
30
31 89 effect on the corneal endothelial density, the morphology and morphometry of corneal
32
33 90 endothelial cells and the CT in dogs.

34 35 36 37 38 39 91 **MATERIALS AND METHODS**

40 41 92 *Animals*

42
43 93 A total of forty-two healthy client-owned dogs were included in the study. Dogs were
44
45 94 evaluated at the Veterinary Teaching Hospital of the Autonomous University of
46
47 95 Barcelona for reasons non-related to the study (vaccinations, neutering surgeries, nodule
48
49 96 exeresis, diagnostic imaging procedures, etc). Data regarding breed, age, gender, neuter
50
51 97 status, life style (indoor, outdoor, semi-outdoor), vaccination status, previous or actual
52
53 98 systemic diseases, deworming and current treatments were also obtained. Fully
54
55 99 informed consent was obtained for each dog.
56
57
58
59
60

1
2
3 100 *Ophthalmic examination*

4
5 101 Ophthalmic examination was performed by means of Schirmer Tear Test I (Schirmer
6
7 102 Tear Test; Merck Animal Health, Summit, New Jersey, USA), slit-lamp biomicroscopy
8
9 103 (Kowa SL-15 portable Slit Lamp Biomicroscope; Kowa Co. Ltd, Tokyo, Japan),
10
11 104 rebound tonometry (Tonovet; Tiolay Oy, Helsinki, Finland) and indirect
12
13 105 ophthalmoscopy (Heine Omega 500; Heine, Herrsching, Germany). Only animals with
14
15 106 no signs of ocular disease were included in the study.

16
17
18
19 107 *Skull index and classification of animals*

20
21 108 In all the dogs, SI was obtained by measuring the skull width (from one zygomatic arch
22
23 109 to the other) and the skull length (from the occipital protuberance to the tip of the nose
24
25 110 or, what is the same, frominion to prosthion). All measurements were obtained by the
26
27 111 same investigator (NC) and thereafter, SI was calculated as follows: (skull
28
29 112 width*100)/skull length. Based on the results, animals were classified into three groups:
30
31 113 brachycephalic (SI>60), mesaticephalic (SI between 50-60) and dolichocephalic
32
33 114 (SI<50).⁽¹⁾

34
35
36
37 115 *Density of corneal endothelial cells, pleomorphism and polymegathism*

38
39 116 Dogs were examined using a non-contact specular microscope (Specular Microscope
40
41 117 SP-2000P; Topcon, Tokyo, Japan) in an automatic mode. The procedure was performed
42
43 118 under sedation in 35/42 dogs. In these animals, the sedation took place in preparation
44
45 119 for the elective surgery or imaging procedure, but not as a mandatory requirement for
46
47 120 the specular microscopy. In 7 animals, a gentle restraint performed by an experienced
48
49 121 handler was enough for performing the specular microscopy. A required working
50
51 122 distance of 25mm was used (Fig.2a), only one randomized eye of each animal being
52
53 123 evaluated (www.random.org). Three microphotographs were obtained from the central
54
55 124 cornea and 30 well-defined cells from each frame (Fig.2b) were closely evaluated to
56
57
58
59
60

1
2
3 125 determine: mean ECD (cells/mm²), mean cell area (μm²), pleomorphism (evaluated by
4
5 126 the percentage of hexagonal cells) and polymegathism (measured by the coefficient of
6
7 127 variation of cell area).

8
9
10 128 *Corneal pachymetry*

11
12 129 Corneal thickness (μm) was measured simultaneously, using the digital pachymeter of
13
14 130 the non-contact specular microscope in an automatic mode. In all eyes, 3 measurements
15
16 131 of the central quadrant of the cornea were obtained and mean CT was calculated.

17
18
19 132 *Statistical analyses*

20
21 133 Results were described by median and interquartile range [25th and 75th percentiles].
22
23 134 An ANOVA analysis with a non-parametrical approach, by rank transformation of
24
25 135 independent variable, were used for inferential analyses in order to assess differences
26
27 136 between SI groups and least significant difference test for post-hoc analyses. All
28
29 137 statistical analyses were performed using SPSS version 20 (IBM) and a two-sided type I
30
31 138 error of 0.05 was used.

32
33
34 139

35
36 140 **RESULTS**

37
38 141 *Animals*

39
40 142 From the forty-two dogs of different breeds included in the study, 24 were females
41
42 143 (57%) and 18 males (43%), of a mean age of 4.6 year (ranging from 2-7 years).

43
44
45 144 *Skull index and classification of animals*

46
47 145 Based on the SI obtained values, 15 dogs were brachycephalic (35.8%; median SI=
48
49 146 74.3), 16 were mesaticephalic (38%; median SI=54.3) and 11 dolichocephalic (26.2%;
50
51 147 median SI=45.7). Mean ages and female/male ratios for the above-mentioned groups
52
53 148 were 4.7, 4 and 5.7 years (p>0.05), and 24/18, 11/5 and 6/5, respectively (p>0.05). In
54
55 149 the brachycephalic group, there were 8 left eyes (OS) and 7 right eyes (OD); in the
56
57
58
59
60

1
2
3 150 mesaticephalic, 10 OS and 6 OD; and in dolichocephalic, 4 OS and 7 OD. Breeds
4
5 151 included in the study are listed in Table 1.

6
7
8 152 *Density of corneal endothelial cells, pleomorphism, polymegathism and CT*

9
10 153 Results for ECD, MCA, pleomorphism, polymegathism and CT, are shown in Table 2
11
12 154 according to the SI. There were no statistical significant differences in any corneal or
13
14 155 endothelial parameter among the three groups. In addition, no statistically significant
15
16 156 differences were observed between males and females, or between right and left eyes.

17
18
19
20 157 **DISCUSSION**

21
22
23 158 The corneal endothelium is a monolayer of polygonal cells on the inner surface of the
24
25 159 cornea that faces the anterior chamber. This corneal layer governs fluid and solute
26
27 160 transport across the posterior surface of the cornea and actively maintains the cornea in
28
29 161 the slightly dehydrated state that is required for optical transparency, ⁽²⁴⁾ determining, in
30
31 162 some way, the CT. When corneal endothelial pump function or integrity of the corneal
32
33 163 endothelial barrier is disturbed, an overhydration of the corneal stroma occurs, and
34
35 164 therefore, CT increases. ⁽²⁴⁾ Consequently, CT is generally considered a sensitive
36
37 165 indirect parameter to determine corneal hydration.

38
39
40
41 166 As previously shown, skull conformation in dogs has been associated to anatomical and
42
43 167 functional differences, not only affecting the eyes, ^(10-12,15,16) but also the rest of the
44
45 168 body. ⁽⁷⁻⁹⁾ To the authors' knowledge, this is the first study in veterinary medicine
46
47 169 evaluating the effect of skull conformation in CT and corneal endothelial parameters.
48
49 170 The obtained results yielded no effects of the skull conformation on the CT, ECD and
50
51 171 morphologic characteristics of the corneal endothelium in healthy dogs.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 172 Corneal thickness has been widely described in the dog and generally considered to
4
5 173 vary between 0.5-0.9 mm. ^(22,23,25) In addition, Dr. Gwin described variations of CT
6
7 174 depending on the age of the animal, being thinner in dogs under 2 years (0.5-0.6mm)
8
9 175 and thicker in dogs over 2 years (0.6-0.9mm). ⁽²³⁾ The results of central CT in the
10
11 176 present study (562µm, 572µm and 621µm in brachycephalics, mesaticephalics and
12
13 177 dolichocephalics, respectively) are very similar to the ones previously reported,
14
15 178 regardless of the skull conformation. This statement is paramount when treating central
16
17 179 corneal ulcers in brachycephalic dogs. Throughout the last years, this skull
18
19 180 conformation has been associated to a higher incidence of complicated central corneal
20
21 181 ulcers. ⁽¹⁵⁾ Some of the anatomic and functional factors predisposing brachycephalic
22
23 182 breeds to corneal ulcerative keratitis include: euryblepharon and secondary
24
25 183 lagophthalmia, entropion, cilia disorders (distichiasis, districhiasis, trichiasis, ectopic
26
27 184 cilia...), slow corneal wound healing, reduced corneal innervation and thus a less
28
29 185 efficient anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). Although the
30
31 186 assumption of a thinner central cornea has been generally suspected in brachycephalic
32
33 187 breeds, to the authors' knowledge there are no published papers confirming this
34
35 188 hypothesis. The present study shows that corneal thickness does not vary among skull
36
37 189 conformation excluding CT as one of the possible causes of the higher incidence of
38
39 190 deep corneal ulcers in brachycephalic dogs.
40
41
42
43
44 191 As previously mentioned, euryblepharon and secondary lagophthalmia, is one of the
45
46 192 most commonly ocular signs seen in brachycephalic dogs, exposing the affected
47
48 193 animals to a higher amount of corneal UV radiation, which has been directly associated
49
50 194 to loss of endothelial cells and increase in pleomorphism in humans. ⁽²⁶⁾ The purpose of
51
52 195 the present study was to evaluate whether if these findings are also seen in dogs.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 196 Endothelial cell density has been previously described in the dog, ranging from 2100-
4
5 197 2816 cell/mm², depending on the age of the animal. ⁽²¹⁻²³⁾ In the present study, median
6
7 198 ECD for the three skull groups (2533 cells/mm² in brachycephalics, 2485 cells/mm² in
8
9 199 mesaticephalics and 2614 cells/mm² in dolichocephalics) were in concordance with the
10
11 200 previously reported ones, showing no statistical differences among groups. In addition,
12
13 201 obtained MCAs for brachycephalic, mesaticephalic and dolichocephalic groups (394,
14
15 202 403 and 387 μm², respectively) were also very similar to the ones previously reported in
16
17 203 dogs (393 μm²). ⁽²⁷⁾
18
19
20 204 Finally, the shape and size of canine corneal endothelial cells have also been previously
21
22 205 described. ⁽²⁷⁻²⁹⁾ The percentage of hexagonal cells found in the present study (80% in
23
24 206 brachycephalic and dolichocephalic groups, and 75.5% in the mesaticephalic group)
25
26 207 was very similar to the one previously reported by Dr. Yee (78%), but slightly higher
27
28 208 than that found by Dr. Pigatto (68%). ^(27,29) Regarding polymegathism (expressed as a
29
30 209 coefficient of variation), our results agreed with the ones previously reported by Dr.
31
32 210 Pigatto (CV = 22). ⁽²⁹⁾ No statistical differences were observed between groups.
33
34
35
36 211 Several physiological factors have been associated with differences in CT and corneal
37
38 212 endothelial parameters in dogs. Aging has been associated with an increase in CT, a
39
40 213 decrease in endothelial cell density and an increase of pleomorphism and
41
42 214 polymegathism. ^(23,25,28,30) In order to avoid a potential confounding effect of age on the
43
44 215 present study, only adult animals, ranging from 2 to 7 years, were included, showing no
45
46 216 statistical significant differences among the 3 groups. There are contradictory results
47
48 217 regarding the effects of gender on CT; while some authors reported that male dogs have
49
50 218 thicker corneas than female, ^(25,31) others could not find any difference. ^(32,33) The results
51
52 219 of the present study suggest that gender does not affect corneal thickness. Animal's
53
54 220 weight is another factor that has also been positively related to corneal thickness. ^(25,31)
55
56
57
58
59
60

1
2
3 221 Unfortunately, the weights of the dogs in the present study were not recorded. However,
4
5 222 the fact that each study group included animals of different sizes and the lack of
6
7 223 differences observed in CT values among the three groups, suggest that weight may not
8
9 224 be affecting the results. In the dog, it has also been published that CT varies depending
10
11 225 on the circadian rhythm, higher CTs being obtained in the morning.⁽³³⁾ Although the
12
13 226 time of the examination was not recorded in the present study, all measurements were
14
15 227 taken in the morning, suggesting no effects on the CT results. Finally, a correlation
16
17 228 between pregnancy and CT has been described in humans, with higher CT during the
18
19 229 second and third trimesters.⁽³⁴⁾ This potential confounding factor can be discarded in
20
21 230 the present study because the reproductive status of each animal was recorded and none
22
23 231 of the females included in the study were pregnant.

24
25
26
27 232 In human ophthalmology, assessment of ECD after corneal storage in eye banks is the
28
29 233 main analysis to determine if a donor cornea can be selected or rejected for corneal
30
31 234 transplant purposes. Because the mean annual rate of endothelial cell loss during the
32
33 235 first 3-5 years after penetrating keratoplasty is much higher than the physiological one
34
35 236 (7.8% vs 0.52%), in most eye banks, donor corneas are not accepted if the ECD is less
36
37 237 than 2000 cells/mm².^(35,36) As endothelial failure has been reported to be the primary
38
39 238 cause of graft failure, transplant donor corneas with high ECD are recommended.⁽³⁶⁾

40
41
42 239 Unfortunately, in veterinary medicine, endothelial cell counts are unusually performed
43
44 240 when selecting potential donor corneas. Despite the fact that studies in humans show
45
46 241 differences in ECDs depending on the race, being some races considered apparently as
47
48 242 more suitable donors, factors such as breed or skull conformation are not usually taken
49
50 243 into consideration in donor dogs.⁽³⁷⁾ The present study suggests that, regarding corneal
51
52 244 thickness and corneal endothelial parameters, skull conformation does not seem to be a
53
54 245 decisive factor when considering a potential donor cornea.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 246 In conclusion, the present study suggests that skull conformation does not affect corneal
4
5 247 endothelial parameters or CT in dogs. This information could be useful when facing
6
7 248 corneal endothelial diseases in dogs, as well as when selecting donor corneas for fresh
8
9 249 keratoplasties.
10
11 250
12
13 251
14
15 252
16
17 253
18
19 254
20
21 255
22
23 256
24
25 257
26
27 258
28
29 259
30
31 260
32
33 261
34
35 262
36
37 263
38
39 264
40
41 265
42
43 266
44
45 267
46
47 268
48
49 269
50
51 270
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

271 **REFERENCES**

- 272 1. Evans H, de Lahunta A. The Skeleton. In: *Miller's Anatomy of the Dog* 4th
273 edition (ed. Evans H, de Lahunta A). Elsevier: St. Louis, 2013; 80–157.
- 274 2. Schoenebeck J, Ostrander E. The genetics of canine skull shape variation.
275 *Genetics* 2013; 193(2):317–325.
- 276 3. Koch D, Wiestner T, Balli A *et al.* Proposal for a new radiological index to
277 determine skull conformation in the dog. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*.
278 2012; 154(5):217–220.
- 279 4. Brehm H, Loeffler K, Komeyli H. Skull forms in dogs. *Anatomia, Histologia,*
280 *Embryologia* 1985; 14(4):324–331.
- 281 5. Regodón S, Vivo J, Franco A *et al.* Craniofacial angle in dolicho-, meso- and
282 brachycephalic dogs: radiological determination and application. *Annals of*
283 *Anatomy* 1993; 175(4):361–363.
- 284 6. McGreevy P, Georgevsky D, Carrasco J *et al.* Dog behavior co-varies with
285 height, bodyweight and skull shape. *PLoS One*. 2013; 8(12):e80529.
- 286 7. Gittleman J. Carnivore olfactory bulb size: allometry, phylogeny and ecology.
287 *Journal of Zoology* 1991; 225:253–272.
- 288 8. Hussein A, Sullivan M, Penderis J. Effect of brachycephalic, mesaticephalic, and
289 dolichocephalic head conformations on olfactory bulb angle and orientation in
290 dogs as determined by use of in vivo magnetic resonance imaging. *American*
291 *Journal of Veterinary Research* 2012; 73(7):946–951.
- 292 9. McGreevy P, Grassi T, Harman A. A strong correlation exists between the
293 distribution of retinal ganglion cells and nose length in the dog. *Brain, Behavior*
294 *and Evolution* 2004; 63(1):13–22.
- 295 10. Townsend W, Bedford P, Jones G. Abnormal Appearance. In: *Small Animal*
296 *Ophthalmology: A problem-Oriented Approach* 4th edition (ed. Peiffer R,
297 Petersen-Jones S). Saunders Elsevier: Philadelphia, 2009; 67–115.
- 298 11. Kafarnik C, Fritsche J, Reese S. Corneal innervation in mesocephalic and
299 brachycephalic dogs and cats: assessment using in vivo confocal microscopy.
300 *Veterinary Ophthalmology* 2008; 11(6):363–367.
- 301 12. Barrett P, Scagliotti R, Merideth R *et al.* Absolute corneal sensitivity and corneal
302 trigeminal nerve anatomy in normal dogs. *Progress in Veterinary and*
303 *Comparative Ophthalmology* 1991; 1(4):245–254.

- 1
2
3 304 13. Miller P. Lacrimal System. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary*
4 305 *Ophthalmology* 4th edition (ed. Maggs D, Miller P, Ofri R). Saunders Elsevier:
5 306 St. Louis, 2008; 157–174.
6
7 307 14. Maggs D. Eyelids. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* 4th
8 308 edition (ed. Maggs D, Miller P, Ofri R). Saunders Elsevier: St. Louis, 2008; 107–
9 309 134.
10
11 310 15. Packer R, Hendricks A, Burn C. Impact of Facial Conformation on Canine
12 311 Health: Corneal Ulceration. *PLoS One*. 2015; 10(5):e0123827.
13
14 312 16. O'Neill D, Lee M, Brodbelt D *et al*. Corneal ulcerative disease in dogs under
15 313 primary veterinary care in England: epidemiology and clinical management.
16 314 *Canine Genetics and Epidemiology* 2017; 4(1):5.
17
18 315 17. Pumphrey S. Canine Secondary Glaucomas. *Veterinary Clinics of North America*
19 316 - *Small Animal Practice* 2015; 45(6):1335–1364.
20
21 317 18. Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Comparison of the corneal endothelium in
22 318 an American and a Japanese population. *Archives of Ophthalmology* 1985;
23 319 103(1):68-70.
24
25 320 19. La Rosa FA, Gross RL, Orengo-Nania S. Central corneal thickness of Caucasians
26 321 and African Americans in glaucomatous and nonglaucomatous populations.
27 322 *Archives of Ophthalmology* 2001; 119(1):23–27.
28
29 323 20. Arıcı C, Arslan OS, Dikkaya F. Corneal endothelial cell density and morphology
30 324 in healthy Turkish eyes. *Journal of Ophthalmology* 2014:852624.
31
32 325 21. Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK *et al*. Postnatal development of corneal
33 326 endothelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1986; 27(1):44–
34 327 51.
35
36 328 22. Stapleton S, Peiffer RL. Specular microscopic observations of the clinically
37 329 normal canine corneal endothelium. *American Journal of Veterinary Research*
38 330 1979; 40(12):1803–1804.
39
40 331 23. Gwin RM, Lerner I, Warren JK *et al*. Decrease in canine corneal endothelial cell
41 332 density and increase in corneal thickness as functions of age. *Investigative*
42 333 *Ophthalmology and Visual Science* 1982; 22(2):267–271.
43
44 334 24. Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye* 1990; 4(3):389–424.
45
46 335 25. Gilger BC, Whitley RD, McLaughlin SA *et al*. Canine corneal thickness
47 336 measured by ultrasonic pachymetry. *American Journal of Veterinary Research*
48 337 1991; 52(10):1570–1572.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 338 26. Karai I, Matsumura S, Takise S *et al.* Morphological change in the corneal
4 339 endothelium due to ultraviolet radiation in welders. *The British Journal of*
5 340 *Ophthalmology* 1984; 68(8):544–548.
6
7 341 27. Yee RW, Edelhauser HF, Stern ME. Specular microscopy of vertebrate corneal
8 342 endothelium: a comparative study. *Experimental Eye Research* 1987; 44(5):703–
9 343 714.
10
11 344 28. Rodrigues G, Laus J, Santos J *et al.* Corneal endothelial cell morphology of
12 345 normal dogs in different ages. *Veterinary Ophthalmology* 2006; 9(2):101–107.
13
14 346 29. Pigatto J, Cerva C, Freire C *et al.* Morphological analysis of the corneal
15 347 endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária.*
16 348 2008; 28(9):427–430.
17
18 349 30. Montiani-Ferreira F, Petersen-Jones S, Cassotis N *et al.* Early postnatal
19 350 development of central corneal thickness in dogs. *Veterinary Ophthalmology*
20 351 2003; 6(1):19–22.
21
22 352 31. Martín-Suárez E, Galán A, Morgaz J *et al.* Comparison of central corneal
23 353 thickness in dogs measured by ultrasound pachymetry and ultrasound
24 354 biomicroscopy. *The Veterinary Journal* 2018; 232:13–14.
25
26 355 32. Park Y, Jeong M, Kim T *et al.* Effect of central corneal thickness on intraocular
27 356 pressure with the rebound tonometer and the applanation tonometer in normal
28 357 dogs. *Veterinary Ophthalmology* 2011; 14(3):169–173.
29
30 358 33. Garzón-Ariza A, Guisado A, Galán A *et al.* Diurnal variations in intraocular
31 359 pressure and central corneal thickness and the correlation between these factors
32 360 in dogs. *Veterinary Ophthalmology* 2017; doi:10.1111.
33
34 361 34. Wang C, Li A, Pang Y *et al.* Changes in intraocular pressure and central corneal
35 362 thickness during pregnancy: a systematic review and Meta-analysis. *International*
36 363 *Journal of Ophthalmology* 2017; 10(10):1573–1579.
37
38 364 35. Thuret G, Manissolle C, Acquart S *et al.* Is manual counting of corneal
39 365 endothelial cell density in eye banks still acceptable? The French experience. *The*
40 366 *British Journal of Ophthalmology* 2003; 87(12):1481–1486.
41
42 367 36. Bourne W. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea* 2001;
43 368 20(6):560–569.
44
45 369 37. Kwon J, Cho K, Kim H *et al.* Analyses of Factors Affecting Endothelial Cell
46 370 Density in an Eye Bank Corneal Donor Database. *Cornea* 2016; 35(9):1206–
47 371 1210.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

372 **TABLES AND FIGURES**373 **Table 1.** Canine breeds included in the study, as well as their skull index (SI)

374 classification in 3 groups (brachycephalic, mesaticephalic and dolichocephalic). n =

375 number of animals of each breed.

Group	Breed	n
Brachycephalic (SI > 60) (n=15)	Chihuahua	4
	Dogue of Bordeaux	3
	Boxer	2
	English Bulldog	1
	Cavalier King Charles Spaniel	1
	Rottweiler	1
	Pomeranian	1
	Yorkshire Terrier	1
	French Bulldog	1
Mesaticephalic (SI 50-60) (n=16)	Crossbred	5
	Beagle	4
	Boxer	1
	Jack Russell Terrier	1
	Labrador Retriever	1
	Dalmatian	1
	Canary Mastiff	1
	Yorkshire Terrier	1
	Canary Islands Hound	1
Dolichocephalic (SI <50) (n=11)	Crossbred	3
	Spanish Wolfhound	2
	Canary Islands Wolfhound	1
	German Shepherd	1
	Poodle	1
	Rottweiler	1
	Doberman	1
Siberian Husky	1	

376

377

378

379

380

381

382

383 **Table 2.** Endothelial cell density (ECD, cells/mm²), corneal thickness (CT, mm), mean
 384 cell area (MCA, μm²), pleomorphism (% of hexagonal cells) and polymegathism (CV)
 385 according to skull conformation in dogs (measured by the skull index, SI). Results are
 386 given by median values, percentiles 25th – 75th and absolute range.

387

	ECD	CT	MCA	Pleomorphism	Polymegathism
Brachycephalic (SI >60)	2533 [2340; 2968] 1983-3068	562 [521; 696] 459-752	394 [336; 428] 325-507	80 [73; 82] 64-86	26 [23; 32] 15-34
Mesaticephalic (SI 50-60)	2485 [2249; 2610] 2019-2954	572 [537; 604] 499-697	403 [384; 446] 339-495	75,5 [74; 78] 62-82	25 [22; 27] 18-34
Dolichocephalic (SI <50)	2614 [2423; 2683] 1780-2843	621 [597; 641] 543-647	387 [373; 413] 351-567	80 [74; 82] 63-90	24 [21; 27] 18-29
<i>p-value</i>	0.537	0.658	0.517	0.479	0.482

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

1
2
3 411 **Figure 1.** Ventral view of a canine skull. Skull index is computed by multiplying the
4
5 412 skull width (a: widest interzygomatic distance) by 100 and dividing the product by the
6
7 413 skull length. Facial and cranial indices are computed in the same manner, although
8
9 414 facial index considers only facial length and the skull width (a), while cranial index
10
11 415 takes into account the cranial length and the cranial width (b: widest interparietal
12
13 416 distance).
14

15
16 417

17 418 **Figure 2. a)** Gently restraint of a Yorkshire Terrier by and experienced handler to
18
19 419 perform non-contact specular microscopy and **b)** selection of 30 well-defined cells from
20
21 420 a central microphotograph of the corneal endothelium.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

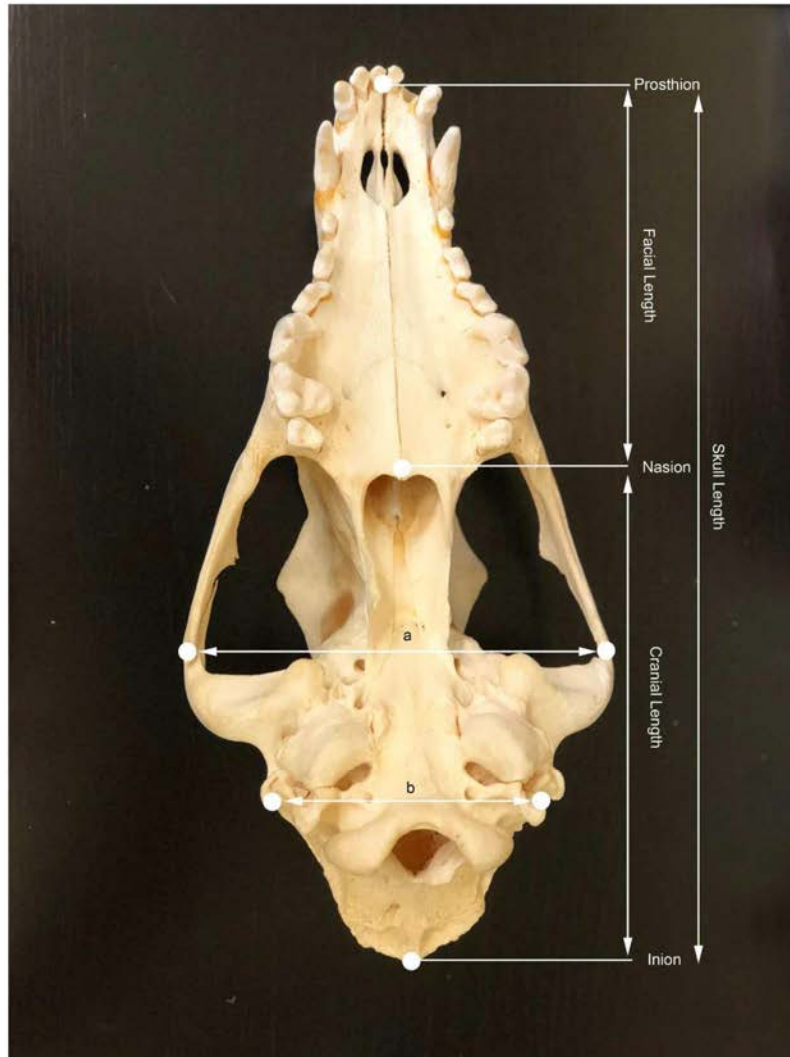


Figure 1. Ventral view of a canine skull. Skull index is computed by multiplying the skull width (a: widest interzygomatic distance) by 100 and dividing the product by the skull length. Facial and cranial indices are computed in the same manner, although facial index considers only facial length and the skull width (a), while cranial index takes into account the cranial length and the cranial width (b: widest interparietal distance).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

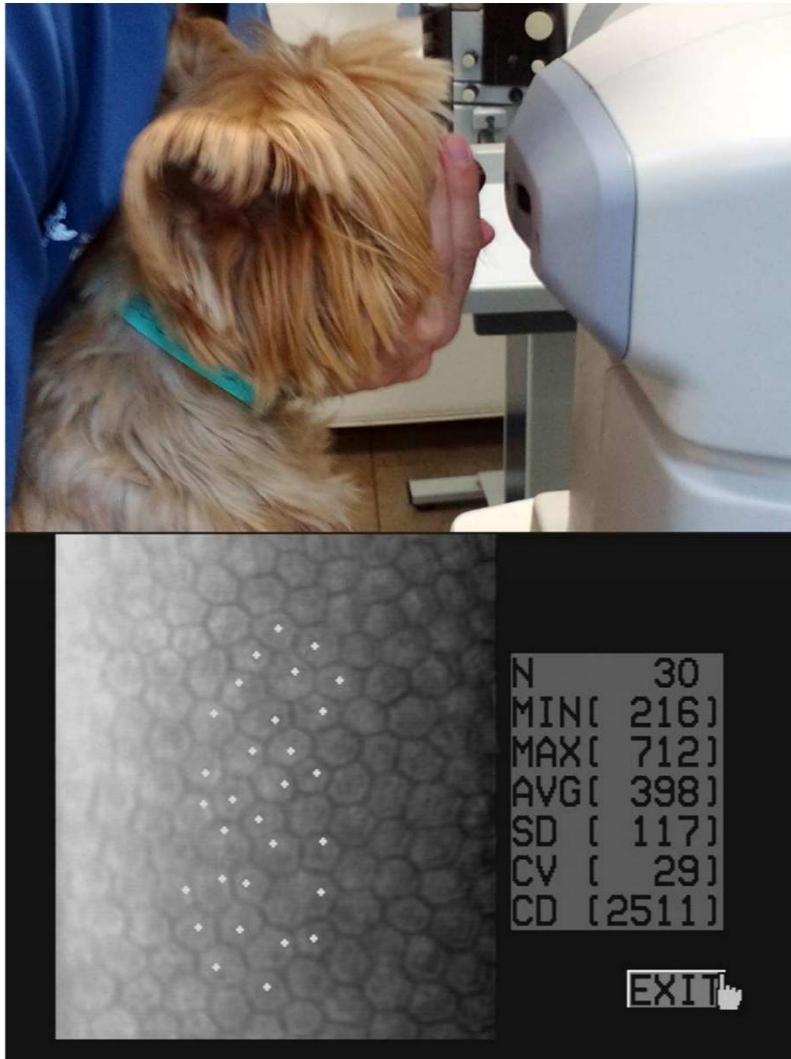


Figure 2. a) Gently restraint of a Yorkshire Terrier by and experienced handler to perform non-contact specular microscopy and b) selection of 30 well-defined cells from a central microphotograph of the corneal endothelium.

254x338mm (72 x 72 DPI)

Discusión

Los estudios incluidos en la presente tesis doctoral determinan la DCE en el c arabo común, el ovino y el caprino. En estas últimas dos especies, además, se determina el GC, poniendo de manifiesto diferencias en estos dos parámetros en los distintos cuadrantes corneales. La morfología y morfometría de las células endoteliales se describe también en dichos estudios. Asimismo, además de evaluar los efectos de la edad sobre los parámetros corneales en las tres especies anteriores, también se evalúa de forma individual el efecto de la raza sobre estos parámetros en la oveja. De forma similar, se evalúa el posible efecto del IC sobre el GC y los parámetros endoteliales corneales en el perro.

Hasta dónde los autores conocen, estos estudios suponen las primeras descripciones del endotelio sano en ovino, caprino y el c arabo común, así como de sus variaciones en función de la raza en el caso del ovino, y de la edad en las tres especies. El estudio en la especie canina también es el primero en evaluar las posibles diferencias en el GC y los parámetros endoteliales en base a la conformación cefálica.

1. GROSOR CORNEAL

El **GC en ovino** se describió en un caso clínico que determinaba un GC de 850 μm , en una oveja de 2 años, mediante microscopía confocal. ⁽¹¹⁹⁾ Posteriormente a la publicación del estudio en ovinos derivado la presente tesis doctoral, el Dr. LoPinto determinó, mediante tomografía de coherencia óptica, un GC de $741.1 \pm 9.9 \mu\text{m}$ en ovejas hembras de raza Dorset de 3 años de edad ($n=10$). ⁽¹²⁰⁾ En el presente estudio, los resultados de GC obtenidos en ovino mediante paquímetro digital integrado en el microscopio especular ($699 \pm 56 \mu\text{m}$ en corderos y $804 \pm 87 \mu\text{m}$ en adultos) son muy similares a los descritos *a posteriori* por el Dr. LoPinto y ligeramente inferiores a los del Dr. Reichard.

En **caprino**, hay dos descripciones del GC previas a la publicación del artículo derivado de la presente tesis. ^(120,121) Los resultados obtenidos en caprino joven (1-4 meses) de raza Murciano-granadina en la presente tesis ($631 \mu\text{m}$) son comparables y similares a los resultados del estudio del Dr. Ribeiro, en el cual se describe un GC de $590 \mu\text{m}$ en caprino de 6 meses de edad y de raza Saanen. En cuanto a los animales viejos (7-10 años), en la presente tesis se obtuvo un

valor de GC de 709 μm , ligeramente superior al resultado obtenido por el Dr. LoPinto en caprino de 6.4 años de razas cruzadas Alpina – Saanen (611 μm).

Los resultados obtenidos de GC para ovino y caprino en la presente tesis, son, además, similares entre sí y las ligeras diferencias con otros estudios pueden estar condicionadas por factores tales como las pequeñas variaciones de edad y/o de la raza. ⁽¹⁹⁾

2. DENSIDAD CELULAR ENDOTELIAL

La DCE se ha descrito en humanos y en diferentes especies animales, ^(22,24,119,122,34,35,57,58,70–73) focalizando su evaluación principalmente en el centro de la córnea.

En nuestro conocimiento, no hay publicaciones previas que describan la DCE en caprinos y cárbos comunes. En **ovino**, en cambio, un artículo estima la DCE en una oveja hembra de edad desconocida en 11319 ± 2081 células/ mm^2 , ⁽¹²³⁾ mediante microscopía electrónica de barrido. Este dato es extremadamente superior al obtenido en esta tesis mediante microscopía especular (3532 ± 259 células/ mm^2 en ovinos jóvenes y 2204 ± 261 células/ mm^2 en ovino adulto). A pesar de que no hay una explicación razonable que justifique estas diferencias, los distintos métodos usados en los estudios, así como la manipulación previa de la muestra en el estudio del Dr. Collin (mediante fijación y almacenamiento durante una semana) pueden explicar, como mínimo en parte, las notables variaciones de DCE entre un estudio y otro.

Los resultados obtenidos en **caprino** (3831 células/ mm^2 en cabritos y 2101 células/ mm^2 en cabras viejas) son muy similares a los publicados previamente en otros ruminantes tales como las alpacas (2275 células/ mm^2) y las llamas (2669 células/ mm^2). ⁽³⁴⁾ Asimismo, también son prácticamente idénticos a los observados en ovejas utilizando la misma metodología.

Los resultados de DCE del **cárbano común** (2864 células/ mm^2 en polluelos y 2602 células/ mm^2 en adultos) son similares a los anteriormente descritos en gansos (2410 células/ mm^2), ⁽¹²⁴⁾ pero son bastante inferiores a los descritos en otras especies de aves. ^(58,75,122,123) Es ampliamente conocido que hay correlación entre la morfología endotelial y la filogenia, ⁽¹²⁴⁾ por lo que es de

esperar que cuanto mayor sean las diferencias evolutivas, mayores sean también las variaciones observadas en las características endoteliales. Por este motivo, sorprenden los resultados de DCE descritos en el cárabo norteamericano (4713 ± 766 células/mm²), mediante microscopía electrónica de barrido, ⁽¹²³⁾ por ser ampliamente superiores a los obtenidos en el cárabo común. Se ha observado que los diferentes patrones de actividad (nocturna, diurna o crepuscular) se asocian a diferencias en la morfología ocular y la organización de la retina. ⁽¹²⁵⁾ Por lo tanto, las diferencias observadas en la DCE entre el cárabo común y el norteamericano pueden deberse a que se haya atribuido un patrón de actividad crepuscular al cárabo común, ⁽¹²⁶⁾ a las diferencias geográficas entre ambas especies, o a los diferentes métodos utilizados para la obtención de los valores.

3. ÁREA MEDIA CELULAR

Los valores de AMC obtenidos en los estudios de **ovino** ($283 \pm 22 \mu\text{m}^2$ en corderos y $473 \mu\text{m}^2$ en adultos) y **caprino** ($255 \mu\text{m}^2$ en cabritos y $466 \mu\text{m}^2$ en caprino viejo) son similares entre ambas especies. Es difícil la comparación con los resultados publicados para otras especies, dado que en muchos casos no se especifica la edad de los animales incluidos en los estudios. Sin embargo, son bastante similares a los descritos en otros mamíferos tales como el perro ($393 \mu\text{m}^2$), ⁽¹²⁴⁾ el gato ($154 \mu\text{m}^2$ en animales jóvenes y $348 \mu\text{m}^2$ en adultos) ⁽²²⁾ y el conejo ($371 \mu\text{m}^2$). ⁽¹²⁴⁾

Los resultados de AMC del **cárabo común** ($348 \mu\text{m}^2$ en polluelos y $384 \mu\text{m}^2$ en adultos) son considerablemente más elevados que los publicados anteriormente en otras especies de aves tales como el avestruz ($269 \mu\text{m}^2$), ⁽¹²²⁾ el pingüino de Magallanes ($269 \mu\text{m}^2$) ⁽⁵⁸⁾ y el pollo ($166 \mu\text{m}^2$). ⁽⁷⁵⁾ Tal y como se ha indicado anteriormente, la DCE en el cárabo común es inferior a la de otras aves, por lo tanto, y debido a que toda la superficie posterior de la córnea debe estar recubierta por células endoteliales para garantizar la buena función del endotelio, es de esperar que sus células sean también de mayor tamaño.

4. PLEOMORFISMO

La pérdida de células endoteliales, ya sea fisiológica o a consecuencia de daño endotelial, suele asociarse con cambios en la forma de las mismas, debido a la nula capacidad de regeneración de esta capa en la mayoría de especies animales en edad adulta. Estas variaciones de morfología pueden cuantificarse mediante el cálculo del pleomorfismo, que se expresa en porcentaje de células hexagonales. ⁽²³⁾

En **ovino** joven y adulto el porcentaje de células endoteliales con forma hexagonal fue de 75.64 ± 3.09 y 69.9 ± 3.42 , respectivamente. Estos resultados son, una vez más, muy similares a los obtenidos en **caprino** joven (80.53%) y adulto (67.8%). En la especie humana se ha descrito que un endotelio sano presenta, como mínimo, un 60% de células hexagonales. ⁽³⁹⁾

Los valores obtenidos en ovino y caprino se asemejan a los anteriormente publicados en otros mamíferos como el perro (68%), ⁽¹²⁷⁾ el conejo (71%) ⁽¹²⁴⁾ o el gato adulto (66%). ⁽²²⁾

Un 72.75% de las células eran hexagonales en el **cárabo común** joven, mientras que en el adulto el porcentaje ascendió al 78.83%. Los resultados obtenidos en esta especie son superiores a los publicados en el pollo (64%), ⁽²³⁾ pero son muy parecidos a los del avestruz (75%), ⁽¹²²⁾ el ganso (79%) ⁽¹²⁴⁾ y el pingüino de Magallanes (80%). ⁽⁵⁸⁾

5. POLIMEGATISMO

En situaciones de daño endotelial, las células próximas a la lesión no solo cambian su forma, sino también su tamaño para tratar de cubrir el defecto. ⁽²³⁾ Estas diferencias de tamaño, o, en otras palabras, el polimegatismo, se pueden calcular mediante el coeficiente de variación.

En **ovino** el CV fue de 18 ± 8.4 y de 18.1 ± 5.2 en corderos y ovejas adultas, respectivamente, mientras que en **caprino** fue de 19 en cabritos y 21 en cabras de avanzada edad. Estos resultados están prácticamente en el rango de valores de normalidad establecidos en oftalmología humana (CV = 22-31 en adultos jóvenes; con una media de 27) ⁽⁴³⁾ y se asemejan a los publicados para el perro (CV=22), ⁽¹²⁷⁾ el conejo (CV=20) ⁽¹²⁴⁾ y el gato (CV=19). ⁽²²⁾

En el **cáرابو común**, se determinó que el polimegatismo era de 21 y 16 en polluelos y adultos, respectivamente. Estos resultados son similares a los citados anteriormente en mamíferos (incluidos los humanos), pero son muy diferentes a los publicados en otras especies de aves como el pingüino de Magallanes (CV=0.08) ⁽⁵⁸⁾ y el avestruz (CV=0.06). ⁽¹²²⁾ Es conocido que los resultados de CV pueden variar incluso entre dos tipos diferentes de microscopio especular de no contacto. ⁽¹²⁸⁾ Por lo tanto, las diferencias entre aves podrían explicarse no solo por las posibles variaciones entre especies, sino por los diferentes métodos de visualización endotelial utilizados.

6. VARIACIONES DE GC Y DCE EN FUNCIÓN DEL CUADRANTE CORNEAL

En **ovino** hay una descripción en la literatura del **GC** periférico, situándolo entre los 300 y los 500 μm . ⁽¹²⁹⁾ Sin embargo, no se especifica el cuadrante de la córnea examinado, la edad del animal o la distancia desde el limbo corneal para la obtención de la medida. Estos resultados difieren de los obtenidos en la presente tesis para el GC periférico (624-885 μm). Además, en el presente estudio, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre cuadrantes, siendo el área dorsal la de mayor grosor (793 \pm 92 μm) y la zona temporal la más delgada (712 \pm 88 μm). Las diferencias observadas entre las descripciones del Dr. Bayer y los resultados obtenidos en el presente estudio, por lo tanto, pueden ser debidas no solo a la edad de los animales, sino también a la zona de cálculo del GC, así como a los diferentes métodos utilizados (medición manual *versus* paquimetría digital).

Tanto en cabritos como en **cabras** viejas el cuadrante dorsal es también el más grueso (646 μm y 751 μm , respectivamente). En animales jóvenes, la zona central (631 μm) también era significativamente más gruesa que las áreas ventral y temporal. Al igual que en ovino, el área temporal era también la más delgada en ambos grupos de edad (571 μm en cabritos y 672 μm en cabras adultas).

Estos resultados son semejantes a los publicados anteriormente en otras especies de mamíferos, donde se observaron también diferencias de GC entre cuadrantes corneales. ^(35,44,130-133)

En referencia a la **DCE** entre cuadrantes en la **especie ovina**, no se observaron diferencias significativas entre zonas. En cambio, en **cabritos**, la DCE ventral resultó ser significativamente más baja en comparación con la del área central, medial y temporal. En cabras viejas, tanto el área dorsal como el ventral presentaron menor DCE en comparación con las áreas central, medial y temporal. Al igual que ocurre en estas dos especies animales, numerosos estudios en otros mamíferos aportan resultados contradictorios, incluso dentro de la misma especie. Algunos autores apuntan a que no hay diferencias de DCE entre la córnea central y la periférica (incluida la especie humana); ^(18,43,134) mientras que otros estudios evidencian diferencias significativas. En el caballo se observó una DCE significativamente menor en el cuadrante ventral en comparación con las áreas medial y lateral. ⁽³⁵⁾ Del mismo modo, algunas descripciones en oftalmología humana apuntan a un valor de DCE mayor en el área superior de la córnea. ⁽¹³⁵⁾

La importancia de esclarecer si hay o no diferencias de GC y DCE entre cuadrantes corneales radica en que, en oftalmología veterinaria, la colaboración del paciente (sobre todo grandes animales) para realizar microscopía especular es mínima o nula. Por lo tanto, en la mayoría de ocasiones, el análisis del endotelio y el GC se efectúa en la córnea central, que es la más accesible. Sin embargo, los resultados de los estudios en ovino y caprino, así como gran parte de los estudios citados anteriormente, apuntan a que la córnea central no es representativa del total.

7. VARIACIONES DE GC Y DCE EN FUNCIÓN DE LA RAZA EN OVINO

En oftalmología humana, diversas publicaciones muestran diferencias en la DCE, el GC y la morfología de las células endoteliales entre diferentes razas o poblaciones. ^(19,41,136,137) En la especie canina, una publicación muestra también diferencias significativas de GCC entre Labrador Retrievers y Beagles, siendo más gruesa la córnea en el primero. ⁽²⁰⁾ Sin embargo, no se esclarece si el mayor grosor en el Labrador es debido realmente a la raza o al peso, ya que este último también se ha asociado a incrementos de GC en la especie canina. ⁽⁴⁴⁾

En el estudio realizado en **ovino** se observaron diferencias significativas en cuanto a GC y CV, siendo superiores estos parámetros en la Rasa Aragonesa en comparación con las Manchegas y las Ripollesas. Sorprendentemente, no se encontraron diferencias significativas en la DCE, la MCA o el pleomorfismo entre las tres razas. Estas semejanzas podrían ser explicadas porque las tres razas pertenecen al tronco entrefino y tienen un antecesor común: *Ovis aries ligeriensis*; ⁽¹³⁸⁾ y, por lo tanto, tienen características anatómicas y productivas similares.

Para tratar de esclarecer si efectivamente existen diferencias en el resto de parámetros entre razas ovinas, sería conveniente realizar estudios con individuos pertenecientes a diferentes troncos ovinos o evolutivamente más alejados.

8. VARIACIONES DE GC Y PARÁMETROS ENDOTELIALES EN FUNCIÓN DE LA EDAD

Tanto en **ovejas** como en **cabras** se observó el descenso de los valores de DCE y porcentaje de células hexagonales con la edad, mientras que los valores de GC y AMC se incrementaron. No se observaron diferencias significativas en el CV entre animales jóvenes y adultos.

Las variaciones de DCE con el envejecimiento se han descrito ampliamente tanto en oftalmología humana ^(33,36-38) como en el gato, ⁽²²⁾ el perro, ⁽¹⁸⁾ el caballo, ⁽³⁵⁾ la llama y la alpaca. ⁽³⁴⁾ Todos los estudios coinciden con los resultados obtenidos en ovino y caprino: la DCE disminuye con la edad. De hecho, en oftalmología humana, se ha determinado que la reducción es del 0.56% células/año entre los 2 y los 98 años de edad. ⁽³³⁾

Concomitantemente a la reducción de DCE, las células no solo aumentan su tamaño para cubrir toda la superficie endotelial, sino que además varían su morfología. Por lo tanto, es de esperar que el AMC aumente y el porcentaje de hexagonalidad disminuya, o, en otras palabras, que aumente el pleomorfismo. El aumento de tamaño de las células con la edad ha sido descrito anteriormente en el perro ⁽¹⁸⁾ y en el gato. ⁽²²⁾ Del mismo modo, también se ha descrito aumento de pleomorfismo con la edad en el hombre y otras especies animales. ^(18,22,38)

Los resultados acerca de las variaciones de CV en función de la edad son dispares entre los estudios publicados en diferentes especies. Debido a que este parámetro suele asociarse a la reducción de la DCE causada por daño endotelial, ⁽²³⁾ no es previsible que el polimegatismo aumente meramente por efecto de la edad, tal y como ocurre en ovino y caprino. A pesar de que varios estudios concuerdan con los resultados obtenidos en la presente tesis, ^(18,22,42) se han publicado otros dónde sí que se observa aumento de polimegatismo con la edad. ^(139,140)

Finalmente, también hay disparidad de opiniones respecto a la evolución del GC a lo largo de la vida. Los estudios realizados en diferentes especies animales muestran aumento de este valor con la edad, ^(18,24,31,44,46,141) incluso algunos estudios realizados en humanos obtienen resultados similares. ^(142,143) Sin embargo, otros estudios publicados en la especie humana sostienen que el GC disminuye con la edad, ^(42,47,48) habiendo argumentos para defender ambos hallazgos. El aumento del GC con la edad podría deberse, al menos en parte, a la deposición de nuevo material en la membrana de Descemet a lo largo de la vida ⁽²³⁾ y/o al aumento del espacio entre las fibras de colágeno del estroma corneal. ⁽¹⁴⁴⁾ Contrariamente, los estudios que abogan por la reducción del GC con el paso de los años argumentan que se ha observado histológicamente que en la córnea humana se reduce el número de queratocitos con la edad, además de la posible destrucción de fibras de colágeno estromal. ⁽⁴⁹⁾

En el **cárabo común**, los resultados obtenidos en función de la edad fueron muy dispares a los obtenidos en rumiantes: no se observaron diferencias significativas de DCE y AMC entre polluelos y adultos y, contra todo pronóstico, se observó aumento significativo del porcentaje de células hexagonales y disminución en el polimegatismo en adultos, en comparación con los polluelos.

Observando los resultados, la primera hipótesis que los investigadores podrían plantearse es la posibilidad de que haya mitosis endotelial en esta especie, hecho que explicaría por qué no disminuye la DCE o por qué no aumenta el AMC con la edad. Sin embargo, los estudios publicados en el conejo, especie en la que se ha demostrado ampliamente la capacidad de mitosis endotelial durante toda la vida del animal, descartan casi por completo esta hipótesis, dado que, a

pesar de haber regeneración celular, la DCE acaba disminuyendo también con la edad. ^(24,145) Además, analizando los números absolutos de DCE y AMC en el cárabo común, sí que puede observarse ligera disminución en los valores de DCE y un pequeño aumento en el AMC en adultos, aunque estas variaciones no son estadísticamente significativas. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que la esperanza de vida del cárabo común en la naturaleza es de aproximadamente 5 años, ⁽¹⁴⁶⁾ lo más probable es que no se observasen diferencias significativas debido a que los animales adultos no eran lo suficientemente viejos como para mostrar variaciones secundarias a la edad, en estos parámetros.

Paralelamente, el pleomorfismo y el polimegatismo sí resultaron significativamente inferiores en adultos en comparación con los polluelos. Esta observación se ha realizado también anteriormente en perros, gatos y conejos muy jóvenes ^(1,25) y aunque no se ha determinado exactamente la razón de estos hallazgos, se ha sugerido que puede ser debido a la actividad mitótica presente en edades muy tempranas, conjuntamente al rápido aumento de tamaño de la córnea. ⁽¹⁴⁷⁾ Por lo tanto, los resultados obtenidos en el cárabo común apuntan a una posible actividad mitótica en animales de muy corta edad en esta especie.

9. VARIACIONES DE GC Y PARÁMETROS ENDOTELIALES EN FUNCIÓN DEL ÍNDICE CEFÁLICO EN LA ESPECIE CANINA

Históricamente las razas caninas se han clasificado en tres grupos en función de su apariencia fenotípica: razas braquicefálicas (cabeza ancha y corta), mesocefálicas (cabeza de proporciones medias) y dolicocefálicas (cabeza alargada y estrecha), asumiendo en muchas ocasiones (de forma errónea) que todos los animales de una misma raza pertenecen a un mismo grupo. La craneología, sin embargo, permite clasificar a cada individuo dentro de uno de los grupos en base a parámetros más objetivos, que, a su vez, permiten obviar el tamaño del animal. Se han descrito tres índices principales: **el índice cefálico (IC), el índice facial y el índice craneal.**

El **IC** se calcula multiplicando la anchura craneal (la mayor distancia comprendida entre un arco cigomático y el otro) por cien y luego dividiendo el resultado entre la longitud del cráneo (del prostion al inion). El **índice facial** y el

craneal se calculan de la misma manera, pero toman en consideración diferentes medidas, así, el índice facial toma como longitud solo la parte más rostral del cráneo (del prostion al nasion) y como anchura (igual que el IC) la distancia intercigomática, mientras que el **índice craneal** se restringe a medir básicamente la cavidad craneal, tomando como longitud la distancia entre el nasion y el inion, y como anchura la distancia interparietal. ⁽¹⁴⁸⁾

Numerosos estudios describen diferencias oculares en base a la conformación craneal, por ejemplo, se ha descrito que los animales braquicefálicos están más predispuestos a presentar euriblefaron, órbitas poco profundas y anchas, ⁽¹⁴⁹⁾ menos sensibilidad corneal, ^(150,151) deficiencia de lágrima, ⁽¹⁵²⁾ y entropión medial y triquiasis ⁽¹⁵³⁾ que consecuentemente predisponen a queratitis pigmentaria, ⁽¹⁴⁹⁾ úlceras corneales complicadas ^(154,155) y uveítis anterior refleja severa. ⁽¹⁵⁶⁾

Por otro lado, son numerosos también los estudios que establecen diferencias en los parámetros endoteliales y/o el GC en función de diferentes factores fisiológicos. De este modo, no solo se han descrito variaciones de estos valores en función de la edad, ^(18,20,40,44) la raza o la población estudiada, ^(19,41,136) sino que, además, se ha observado en humanos que el polimegatismo aumenta mientras que la DCE disminuye en aquellos individuos más expuestos a radiación ultravioleta. ⁽¹¹⁷⁾ Cabe pensar, por tanto, que los perros braquicefálicos, al tener más comúnmente euriblefaron y deficiencias asociadas en el cierre palpebral, podrían estar más expuestos a este tipo de radiación, presentando alteraciones también en dichos parámetros. Algunos estudios apuntan además a que el GC es superior en los machos que en las hembras ^(44,157) aunque otros autores no han encontrado diferencias en base al género. ^(158,159) También se ha descrito que el GC varía en función del peso del animal, siendo más gruesas las córneas en animales más pesados, ^(44,157) aunque no se conoce con exactitud cómo el peso influencia al GC. ⁽¹⁵⁷⁾ Por otro lado, se ha establecido que el GC de un mismo perro puede variar en función del momento del día en que se mida este parámetro: un estudio indica que los valores de GCC eran superiores por la mañana que durante la tarde y la noche. ⁽¹⁵⁹⁾ Finalmente, los valores de GC también difieren en mujeres embarazadas, cuyas corneas son más gruesas en el segundo y tercer trimestre del embarazo. ⁽¹⁶⁰⁾

Según hemos podido constatar, este estudio es el primero en evaluar si el GC o los parámetros endoteliales varían en función de la conformación craneal, determinada en base al índice cefálico.

Los valores de GC obtenidos en el estudio ($562\mu\text{m}$, $572\mu\text{m}$ y $621\mu\text{m}$ en braquicefálicos, mesocefálicos y dolicocefálicos, respectivamente) son muy similares a los anteriormente publicados en la especie canina ($0.5\text{-}0.9\text{mm}$), ^(18,44,70) no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. La ausencia de variaciones de GC en función del IC es relevante para abordar el tratamiento de úlceras corneales, especialmente en animales braquicefálicos, dado que históricamente se ha atribuido a este grupo mayor predisposición a presentar úlceras corneales complicadas. ⁽¹⁵⁴⁾ De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, el GC no parece ser un factor que contribuya a la aparición de este tipo de lesiones en animales braquicefálicos, dado que no difiere en función de la conformación craneal.

Tal y como se ha descrito anteriormente, el GC varía en función de parámetros tales como la edad, ^(18,20,40,44) el peso, ^(44,157) el ritmo circadiano ⁽¹⁵⁹⁾ o la gestación. ⁽¹⁶⁰⁾ Para evitar posibles sesgos en la obtención de los valores de GC, solo se incluyeron animales de 2 a 7 años de edad, todas las medidas se tomaron durante la mañana y se consideró el estado reproductivo de las hembras. A pesar de que no se tuvo en cuenta el peso de los animales, el hecho de que todos los grupos incluyeran animales de diferente tamaño y raza, sumado a la ausencia de diferencias de GC entre grupos (así como el solapamiento de valores en los rangos intercuartílicos de los tres grupos), hace pensar que este factor no tuvo influencia en los resultados.

Los resultados de AMC obtenidos ($394\mu\text{m}^2$, $403\mu\text{m}^2$ y $387\mu\text{m}^2$ en braquicefálicos, mesocefálicos y dolicocefálicos, respectivamente) son también similares a los anteriormente descritos en esta especie ($393\mu\text{m}^2$). ⁽¹²⁴⁾ Del mismo modo, el pleomorfismo (80% de células hexagonales en braquicefálicos y dolicocefálicos, y 75.5% en los mesocefálicos) y el polimegatismo (CV de 26, 25 y 24 en braquicefálicos, mesocefálicos y dolicocefálicos, respectivamente) son muy similares a los descritos anteriormente en el perro [78% de células

hexagonales ⁽¹²⁴⁾ y CV:22 ⁽¹²⁷⁾]. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros entre los tres grupos.

Diferentes estudios sitúan la DCE canina en torno a 2100-2816 células/mm² en función de la edad del animal. ^(18,31,70) Los resultados obtenidos en el estudio son muy similares a los descritos anteriormente (2533 células/mm² en braquicefálicos, 2485 células/mm² en mesocefálicos y 2614 células/mm² en dolicocefálicos). Una vez más, tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a DCE entre los tres grupos.

En humana, el recuento de células endoteliales es el parámetro más importante para determinar si una córnea es válida o no como donante fresco, siendo rechazadas aquellas córneas con DCE inferior a 2000 células/mm². El motivo principal de esta exclusión se debe a que durante los 3 a 5 primeros años tras el trasplante, la pérdida de células del endotelio trasplantado es muy superior a la de un endotelio normal (7.8% en vez de 0.52% por año). ^(161,162) En oftalmología veterinaria, en cambio, es infrecuente realizar recuentos de DCE para seleccionar un potencial donante corneal. Además, tampoco suelen tenerse en cuenta la raza, a pesar de que aparentemente, en oftalmología humana, hay poblaciones o razas consideradas como mejores donantes. ⁽¹⁶³⁾ La ausencia de diferencias significativas entre grupos, no solo en cuanto a DCE si no en el resto de parámetros endoteliales y GC, sugieren que la conformación craneal no debe considerarse un factor determinante para seleccionar a un potencial donante de córnea, en lo referente a la calidad del endotelio.

LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS

Una posible limitación tanto en el estudio de **ovino** como en el de **caprino**, ambos realizados *ex vivo*, es el tiempo transcurrido entre la enucleación y el inicio del análisis mediante microscopía especular (de 4 a 12h en el caso de ovino y antes de 3h en caprino). En el estudio de cabras este tiempo pudo reducirse dado que las muestras fueron obtenidas mayoritariamente en la misma facultad de veterinaria o en el peor de los casos, en un matadero cercano. Por el contrario, ciertas muestras en ovino fueron obtenidas en mataderos de poblaciones situadas a más de 300km del laboratorio, por la imposibilidad de encontrar ejemplares jóvenes y adultos de una misma raza en los alrededores.

Para minimizar el potencial sesgo en los valores endoteliales y de GC debido al posible daño endotelial por el paso del tiempo, una vez en el laboratorio se realizó un detallado examen mediante biomicroscopía en todos los globos oculares, descartando aquellos que presentasen cualquier indicio de degeneración o alteración (por ejemplo, edema), ya fuese durante el examen con lámpara de hendidura o durante la microscopía especular.

Otra posible limitación en el caso de **ovino**, como ya se ha mencionado anteriormente, es que las tres razas evaluadas pertenecían al comúnmente denominado “tronco entrefino” y presentaban un antecesor común. Este hecho pudo haber enmascarado más diferencias en los parámetros endoteliales entre diferentes razas de los que se encontraron. No fue posible el estudio y la inclusión de razas de diferentes troncos ovinos, dado que la obtención de muestras *ex vivo* se hubiera tenido que realizar en mataderos aún más lejanos, lo que hubiera conllevado mayor tiempo entre la enucleación y el examen de los globos, exacerbando los daños endoteliales que, de manera casi inevitable, se producen *post mortem*.

En el estudio del endotelio corneal del **cárabo común** la principal limitación fue la imposibilidad de obtener datos exactos de la edad de los animales. A pesar de que es relativamente sencillo diferenciar a un ejemplar muy joven de uno ya adulto, establecer la edad concreta es más complicado. En base a datos anteriores, los autores del estudio creen que los animales adultos debían tener una edad máxima de 5 años, que es la esperanza de vida que suele tener esta especie en libertad. ⁽¹⁴⁶⁾ Por lo tanto, se sugiere evaluar ejemplares adultos que hayan permanecido durante varios años en centros de recuperación (con el fin de cerciorarse que son animales de más de 5 años de edad) para confirmar/desmentir los hallazgos encontrados en el presente estudio.

Finalmente, en el estudio en la **especie canina**, se empleó únicamente el IC como valor para diferenciar los tres tipos clásicos de conformación craneal en perros (braquicefálicos, mesocefálicos y dolicocefálicos). Sería recomendable la realización de futuros estudios en los que se tuviera en cuenta el efecto del índice facial y/o craneal sobre los parámetros endoteliales y/o GC.

Conclusiones

CONCLUSIONES EN LA ESPECIE OVINA

1 En los corderos la **densidad celular endotelial** es de 3532 ± 259 células/mm², el **área media celular** es de $283 \pm 22 \mu\text{m}^2$, el **porcentaje de células hexagonales** es de $75.64 \pm 3.09\%$, el **coeficiente de variación** es 18 ± 8.4 y el **grosor corneal** es $699 \pm 56 \mu\text{m}$. En el ovino adulto la **densidad celular endotelial** es de 2204 ± 261 células/mm², el **área media celular** es $473 \pm 53 \mu\text{m}^2$, el **porcentaje de células hexagonales** es de $69.9 \pm 3.42\%$, el **coeficiente de variación** es 18.1 ± 5.2 y el **grosor corneal** es de $804 \pm 87 \mu\text{m}$. Los resultados obtenidos en ovino son muy similares a los anteriormente publicados en otros mamíferos.

2 Hay variaciones de grosor corneal entre los **diferentes cuadrantes** de la córnea en ovino, por lo tanto, la córnea central no debe considerarse como representativa del total en esta especie.

3 Excluyendo el polimegatismo, en ovino los parámetros endoteliales y el grosor corneal varían con la **edad**.

4 Hay variaciones en el grosor corneal y en el polimegatismo entre diferentes **razas** ovinas.

CONCLUSIONES EN LA ESPECIE CAPRINA

1 En los cabritos la densidad celular endotelial es de 3831 células/mm², el área media celular es de 255μm², el porcentaje de células hexagonales es de 80.53%, el coeficiente de variación es 19 y el grosor corneal de 608μm. En el caprino viejo, la densidad celular endotelial es de 2101 células/mm², el área media celular es de 466μm², el porcentaje de células hexagonales es de 67.8%, el coeficiente de variación es 21 y el grosor corneal es de 706μm. Los resultados obtenidos en caprino son muy similares a los anteriormente publicados en otros mamíferos.

2 Hay variaciones de grosor corneal y densidad celular endotelial entre los diferentes cuadrantes de la córnea en caprino, por lo tanto, la córnea central no debe considerarse representativa del total en esta especie.

3 Excluyendo el polimegatismo, en caprino los parámetros endoteliales y el grosor corneal varían con la edad.

CONCLUSIONES EN EL CÁRABO COMÚN

1 En el polluelo de cárabo común, la **densidad celular endotelial** es de 2864 células/mm², el **área media celular** es de 348µm², el **porcentaje de células hexagonales** es de 72.75% y el **coeficiente de variación** es de 21. En el cárabo común adulto, la **densidad celular endotelial** es de 2602células/mm², el **área media celular** es de 384µm², el **porcentaje de células hexagonales** es de 78.83% y el **coeficiente de variación** es 16. Los resultados obtenidos en el cárabo común difieren bastante de los publicados anteriormente en otras especies de aves.

2 No se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la densidad y el área media celular **entre cárabos jóvenes y adultos**, probablemente por la temprana edad de estos últimos. Sin embargo, el pleomorfismo y el polimegatismo son mayores en los polluelos, probablemente por la presencia de **actividad mitótica** en esta especie en animales muy jóvenes.

CONCLUSIONES EN LA ESPECIE CANINA

1 En la especie canina, el **índice cefálico** del animal no es un factor determinante que haga variar los parámetros endoteliales y el grosor corneal. Consecuentemente, por lo que se refiere al endotelio corneal, los animales braquicefálicos son tan buenos candidatos como cualquier otro a la cirugía intraocular o como donantes de córnea.

Anexo

El endotelio corneal y sus principales enfermedades en el perro

The corneal endothelium and its main diseases in the dog

N. Coyo,¹ M. Leiva,^{1,2} T. Peña^{1,2}

¹Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària. ²Servei d'Oftalmologia, Fundació Hospital Clínic Veterinari, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

Resumen

El endotelio corneal es una monocapa de células poligonales situada en la parte más interna de la córnea, en contacto con el humor acuoso. Esta capa controla el transporte de agua y nutrientes hacia la córnea y preserva la transparencia corneal. Las alteraciones primarias más comunes de esta capa en el perro incluyen la distrofia endotelial corneal, la distrofia polimórfica posterior y la degeneración endotelial senil. Entre las endotelio patías secundarias encontramos una gran variedad de causas tanto oculares (uveítis anterior, glaucoma...) como sistémicas (diabetes, hepatitis infecciosa canina...). Cualquier alteración del endotelio corneal se traducirá en la aparición de edema corneal difuso, de mayor o menor grado siendo necesario conocer la causa de dicho edema para establecer el tratamiento y pronóstico correcto.



Palabras clave: Edema corneal, microscopía especular, distrofia endotelial, endotelio patías.

Keywords: Corneal edema, specular microscopy, endothelial dystrophy, corneal endothelium diseases.

Clin. Vet. Peq. Anim., 2017, 37 (3): 171 - 180

Introducción

La córnea es una estructura lisa, avascular y transparente formada por cuatro capas en el perro. La capa más interna de la córnea es el endotelio corneal; se trata de una monocapa de células poligonales (en su mayoría hexagonales) que controla el paso de nutrientes y humor acuoso a través de la córnea. Esta función la desempeña gracias a mecanismos de transporte pasivos y activos (posee una potente bomba sodio-potasio ATPasa) que permiten preservar la transparencia corneal.

En el perro existen tres patologías endoteliales primarias descritas: la distrofia endotelial corneal (muy similar a la distrofia de Fuchs en humanos), la distrofia polimórfica posterior (también presente en humanos) y la degeneración endotelial senil.

Existe una gran variedad de enfermedades y factores que producen alteración endotelial secundaria, tales como el glaucoma, la uveítis anterior, la diabetes, las cirugías intraoculares, la hepatitis infecciosa canina, etc.

Contacto: vetnie@gmail.com

El principal signo clínico de una alteración endotelial es el edema difuso corneal, ya que el endotelio no puede ejercer correctamente su función. Este edema corneal puede ser de mayor o menor gravedad en función de la causa que lo produzca y, en diferentes casos, puede producir ceguera. Es necesario, por tanto, detectar la causa subyacente de dicha alteración.

En el presente artículo de revisión, se explicarán en profundidad las enfermedades y causas más frecuentes que pueden producir endotelio patías, así como los signos clínicos y hallazgos microscópicos que podemos encontrar en cada una de ellas. El tratamiento variará en función de si estamos ante una patología primaria o secundaria, así como el pronóstico.

Anatomía básica de la córnea

La córnea es una estructura lisa, avascular y transparente que forma parte de la túnica fibrosa y se sitúa en la parte más anterior del globo ocular (Fig.1). Entre sus



Coyo et al

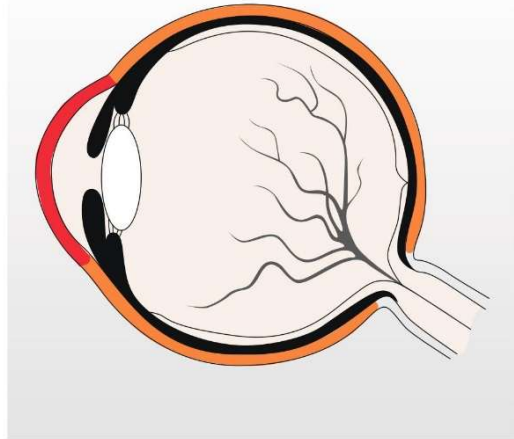


Figura 1. Esquema del globo ocular del perro. La córnea (color rojo) y la esclera (color naranja) conforman la túnica más externa del globo ocular, también llamada túnica fibrosa.

principales funciones cabe destacar proporcionar soporte a las estructuras intraoculares y refractar y transmitir la luz. En el perro, el poder dióptrico de la córnea es de 40-42 dioptrías, y su forma es ligeramente elíptica (diámetro horizontal ligeramente superior al vertical).¹

Al ser una estructura avascular, la nutrición corneal depende, en gran medida, del humor acuoso y de la película lagrimal, por lo que alteraciones en alguno de estos medios líquidos pueden inducir enfermedades corneales de diferente severidad. Los párpados y la membrana nictitante tienen un papel importante en la protección corneal.¹

El grosor de la córnea varía en función de diferentes variables, tales como la especie, la raza y la edad. En el perro, el grosor corneal es de 0,45-0,55 mm en el centro, y de 0,50-0,65 mm en la periferia, mientras que en el gato oscila entre 0,8-1 mm en el centro y 0,4-0,6 mm en la periferia.¹ Diversos estudios demuestran que el grosor corneal aumenta con el paso del tiempo,^{2,7} pudiendo variar su magnitud según la raza.^{3,4,7}

En el perro, la córnea se compone de cuatro capas diferenciadas que son, de fuera a adentro, el epitelio, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio corneal (Fig. 2). En el ser humano, así como en primates, varias especies de aves, el ciervo y la jirafa, entre otros,⁸ se aprecia una quinta capa, ubicada entre el epitelio y el estroma corneal, llamada membrana de Bowman (o membrana basal del epitelio). Finalmente, un estudio

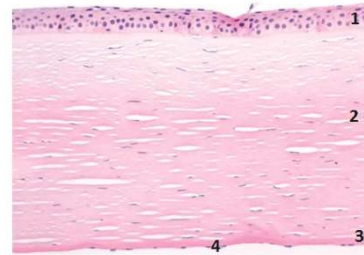


Figura 2. Imagen histológica de la córnea del perro. Nótese las capas corneales (de fuera a adentro): epitelio (1), estroma (2), membrana de Descemet (3) y endotelio corneal (4).

reciente describe una sexta capa en humanos denominada *Dua's Layer*, situada entre el estroma y la membrana de Descemet.⁹

Morfología y fisiología del endotelio corneal

El endotelio corneal es una monocapa de células poligonales, mayoritariamente hexagonales, situada en la parte más interna de la córnea, en contacto directo con el humor acuoso. Su función principal es el control del transporte de agua y nutrientes desde la cámara anterior al estroma corneal, preservando de esa forma la transparencia de la córnea.

A pesar de que la córnea se sitúa entre dos medios líquidos (la lágrima y el humor acuoso), ésta se mantiene en un estado de deshidratación parcial gracias al epitelio y al endotelio. Ambos actúan como barrera física frente a la entrada de agua desde la película lagrimal y el humor acuoso, respectivamente. El endotelio corneal, a diferencia del epitelio, posee uniones intercelulares discontinuas (*zonula occludens* incompleta),

lo que hace que la barrera física que constituye permita un acceso controlado de nutrientes hacia el estroma corneal.¹⁰ Además, el endotelio tiene una potente bomba activa sodio-potasio ATPasa que facilita la eliminación del líquido que ya ha entrado en el estroma corneal (Fig. 3). A pesar de que esta bomba se ha estudiado ampliamente, todavía existe controversia en la actualidad acerca de qué iones son los que intervienen en el proceso, aunque se sabe que la bomba sodio-potasio ATPasa requiere bicarbonato y la actividad de la enzima anhidrasa carbónica para su buen funcionamiento.¹¹

La función del endotelio corneal es decisiva para el mantenimiento de la deshidratación y del grosor corneal.¹² Tanto en edemas de origen epitelial como endotelial, al hidratarse el estroma corneal, las fibras de colágeno que lo conforman se engrosan y pierden su equidistancia, haciendo que la luz sea refractada y la córnea pierda su transparencia, dando un aspecto azu-

El endotelio controla el transporte de agua y nutrientes al estroma preservando la transparencia corneal

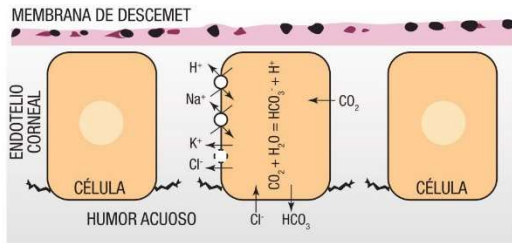


Figura 3. Esquema general de la bomba endotelial y los iones que intervienen en el proceso.

lado o edematoso característico (Fig. 4) que suele ser difuso si la lesión es de origen endotelial y localizado si es epitelial (Fig. 5).

En perros, la densidad celular endotelial media es de 3600 células/mm²,¹³ pero a medida que el animal envejece, se reduce pudiendo llegar incluso al 50 % de su dotación endotelial inicial.¹ En el hombre se ha establecido una velocidad anual media de disminución de la densidad del endotelio corneal del 0,52 %.¹⁴ Simultáneamente a la reducción en la densidad celular, el tamaño medio de cada célula aumenta y la forma celular se modifica, siendo menos uniformes y hexagonales. Estos cambios morfológicos se deben principalmente a la ausencia de actividad mitótica de las células endoteliales en la mayoría de especies animales.¹⁵ Ello provoca que, al no haber renovación celular, el defecto que dejan las células muertas que se descaman hacia

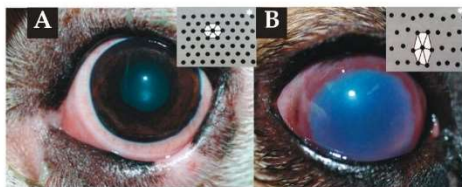


Figura 4. (A) La transparencia corneal depende en gran medida de la disposición de las fibras de colágeno del estroma (*). (B) En los edemas corneales, el estroma se hidrata y las fibras de colágeno se engrosan y pierden su equidistancia, produciendo un aspecto azulado característico.

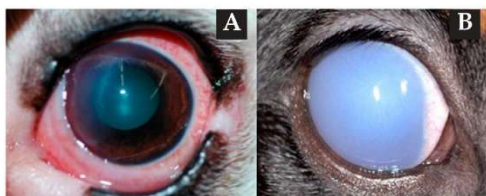


Figura 5. (A) Las lesiones de origen epitelial suelen dar lugar a edemas localizados. (B) Los edemas de origen endotelial suelen ser difusos.

el humor acuoso sea cubierto por la hipertrofia de las células colindantes, que se alargan y adelgazan para cubrir el defecto dejado, cambiando su morfología habitual. Como consecuencia de esta reparación, la hexagonalidad de las células disminuye (aumenta el pleomorfismo) y las diferencias de tamaño entre células son mayores (aumenta el polimegatismo) (Fig. 6). Si, por el contrario, la lesión endotelial es tan extensa que reduce la densidad por debajo de 500 células/mm², la función endotelial se ve comprometida y se acumula agua en el estroma corneal, produciéndose un edema marcado.¹⁵

Métodos diagnósticos en casos de sospecha de enfermedad endotelial

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, pero la información que proporciona es limitada. Este método diagnóstico, en manos de un oftalmólogo experimentado, permite detectar signos de distrofia endotelial en fases tempranas, así como

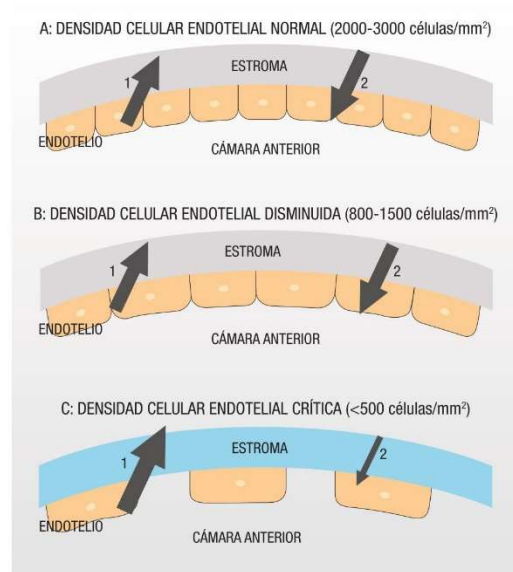


Figura 6. (A) Si la densidad celular endotelial es adecuada (2000-3000 células/mm²), el humor acuoso (1) que penetra a través de las uniones celulares endoteliales es enviado hacia la cámara anterior (2) mediante la bomba endotelial, manteniéndose de esa forma el equilibrio endotelial. (B) Al empezar a disminuir la densidad endotelial, el endotelio corneal adopta dos mecanismos compensatorios: las células restantes aumentan su tamaño y modifican su forma, y aparecen más bombas endoteliales. Gracias a estas dos adaptaciones la fuga de humor acuoso sigue siendo igual a la devolución. (C) Por el contrario, si la densidad celular endotelial es inferior a 500 células/mm², la función del endotelio se ve comprometida y el humor acuoso entra en mayor cantidad al estroma y no puede ser evacuado, produciéndose un edema estromal.

clasificar el grado de transparencia corneal o inflamación secundaria. El endotelio corneal puede observarse mediante el reflejo especular, que se visualiza con hendidura gruesa cuando el ángulo de reflexión es igual al ángulo de incidencia del haz de luz (paralelepípedo).¹⁶

En situaciones más específicas de daño endotelial, se puede realizar un estudio morfométrico mediante microscopía especular (ME). La ME se basa en el principio de que un haz de luz proyectado hacia el interior del globo ocular se refleja en el endotelio corneal proporcionando una imagen definida de su anatomía. Esto se produce debido a que el índice refractivo del endotelio es mayor que el del humor acuoso, por lo que un 0,022 % de la luz proyectada se refleja, emitiendo una imagen que es captada y magnificada por el microscopio especular.^{17,18} (Fig. 7) Mediante esta herramienta, podemos determinar la densidad y la superficie de las células endoteliales, así como el grado de pleomorfismo y polimegatismo. En oftalmología humana, la ME se usa frecuentemente en clínica y en investigación para valorar la evolución de ciertas enfermedades endoteliales. Al tratarse de una técnica diagnóstica no invasiva, rápida y no dolorosa, no requiere anestesia ni sedación en la mayoría de pacientes. En veterinaria su uso es menos frecuente, a pesar de que se han publicado artículos abogando por él.^{6,19,20}

Hay dos tipos básicos de microscopio especular, el de contacto y el de no contacto. En la microscopía especular de contacto la lente del objetivo se sitúa en contacto directo con la superficie corneal, lo que permite eliminar el reflejo de luz epitelial. Por el contrario, en la mi-

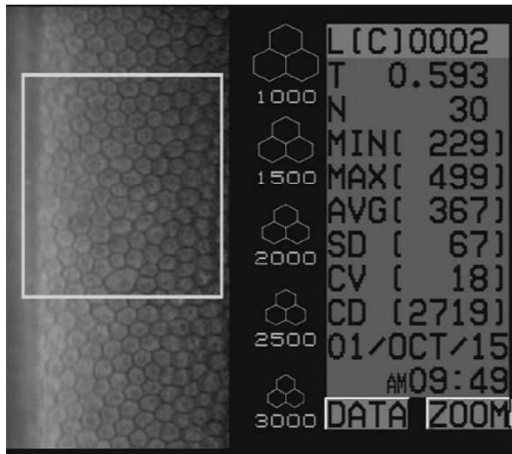


Figura 7. Microfotografía del endotelio corneal normal de un perro cruzado de 2 años de edad, macho castrado, obtenida mediante microscopía especular de no contacto. N = número de células seleccionadas para el análisis, CD = densidad celular endotelial, T = grosor corneal, AVG = área media celular, CV = coeficiente de variación, que hace referencia al polimegatismo de la imagen.

croscopía de no contacto el examinador debe encontrar el reflejo especular (igual que con la lámpara de hendidura). El microscopio de contacto es más fácil de usar, la magnificación es mayor y también la resolución. Sin embargo, la manipulación de la córnea con este microscopio puede dar lugar a artefactos y molestias para el paciente.²¹ Con el microscopio de no contacto el campo de visión es menor, pero no provoca molestias para el paciente, lo que lo convierte en una herramienta útil para valorar el endotelio en animales.¹⁸

Enfermedades endoteliales descritas en el perro

Las enfermedades endoteliales en el perro pueden clasificarse en primarias o secundarias. Los procesos primarios en esta especie son poco frecuentes e implican mayor dificultad diagnóstica, al no haber otros signos clínicos asociados. Las enfermedades primarias más documentadas incluyen: distrofia endotelial, distrofia polimórfica posterior y degeneración endotelial. Los procesos secundarios son más frecuentes, pudiendo estar asociados a procesos intraoculares tales como uveítis, glaucoma o luxación de cristalino, entre otros.

Endoteliopatías primarias en el perro

Distrofia endotelial corneal

Definición, incidencia y signos clínicos

La Distrofia Endotelial Corneal (DEC) consiste en la aparición de edema corneal espontáneo y progresivo como consecuencia de células endoteliales anormales y distróficas. La clínica de la DEC en el perro es similar a la Distrofia de Fuchs en el ser humano. Esta última se caracteriza por pérdida progresiva de células endoteliales, aumento en el grosor de la membrana de Descemet y deposición de una matriz extracelular en forma de "gotas" (*guttae*).²² Las células restantes del endotelio no pueden ejercer su función correctamente, generándose un intenso edema estromal que puede llevar a grosores corneales superiores a 1 mm. Cuando el edema es muy intenso, el epitelio puede desprenderse de su membrana basal, creando bullas dolorosas en la superficie anterior de la córnea.²³ La enfermedad es bilateral y más frecuente en mujeres a partir de los 50 años de edad con factores de riesgo tales como la radiación ultravioleta, el peso corporal y el tabaco.²⁴

La DEC en el perro se presenta de forma más frecuente en el Boston Terrier, el Chihuahua y el Teckel,²⁵ aunque también se ha descrito en otras razas.² Se desconoce su heredabilidad, aunque en algunas de las razas afectadas se recomienda no incluir a los animales afectados en programas de cría.²⁶ Los signos clínicos suelen ser también bilaterales (aunque asincrónicos) y más frecuentes en hembras de edad adulta (a partir de

los 5 años de edad). Las áreas de la córnea afectadas son azuladas-blanquecinas y no muestran signos de inflamación. La lesión inicial suele ser focal y situada en la zona temporal, aunque progresa durante meses a años y acaba afectando la totalidad de la córnea. Igual que ocurre en la Distrofia de Fuchs, cuando el edema es severo pueden formarse bullas epiteliales que desprenden el epitelio y causan úlceras corneales dolorosas. En casos severos, puede incluso aparecer neovascularización corneal. Los hallazgos microscópicos son los mismos que en la Distrofia de Fuchs: disminución de la celularidad endotelial, abultamientos en la membrana de Descemet (*guttæ* corneal) y pérdida de la hexagonalidad celular.²⁷ En microscopía especular se pueden observar puntos negros o agujeros en el patrón endotelial, lo que indica muerte celular endotelial.²

Diagnóstico, tratamiento y pronóstico

El diagnóstico de la DEC se realiza en base a los signos clínicos observados: opacidad corneal azulada-blanquecina, sin vascularización ni hiperemia conjuntival. Posteriormente, en el examen con lámpara de hendidura puede apreciarse aumento en el grosor corneal, opacidad corneal, bullas epiteliales y cicatrices subepiteliales. El diagnóstico definitivo debe llevarse a cabo mediante microscopía especular.²⁸

El tratamiento inicial se realiza mediante terapia tópica, siendo las sustancias hiperosmóticas (cloruro sódico al 5 %) las más utilizadas. Este tratamiento es paliativo, por lo que deberá mantenerse durante toda la vida o hasta que aparezcan complicaciones que requieran tratamiento quirúrgico (úlceras corneales recidivantes). En oftalmología humana se han descrito diferentes técnicas quirúrgicas para tratar aquellos casos recalcitrantes en los que el edema corneal induce déficits visuales o molestias crónicas que no responden al tratamiento tópico. Entre las técnicas más utilizadas en la actualidad destacan los trasplantes laminares específicos para la zona afectada y el *cross-linking*.^{24,29,30} Entre las técnicas de trasplante mínimamente invasivas cabe destacar la Queratoplastia Endotelial Laminar Profunda (*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).^{31,32}

En perros son muy pocas las descripciones de tratamiento quirúrgico paliativo para esta enfermedad, siendo la termoqueratoplastia, el colgajo conjuntival (técnica de *letter box*) y el *cross-linking* los más cita-

dos. Los perros con queratopatía bullosa persistente o con úlceras recurrentes pueden beneficiarse de la termoqueratoplastia, en la cual se cauterizan diferentes puntos superficiales con el objetivo de crear cicatrices subepiteliales que actúen como barrera al líquido causante de las bullas.³³ El colgajo conjuntival (en 360° o en *letter box*) está indicado en casos de edemas corneales con ulceraciones corneales recidivantes, ya que el aporte vascular reduce el edema, facilitando la cicatrización corneal.^{34,35} El *cross-linking* del colágeno corneal (CXL por sus siglas en inglés) es una técnica nueva que aumenta la fuerza mecánica y bioquímica de la córnea. La radiación ultravioleta A en presencia de riboflavina induce la formación de uniones covalentes en la superficie de las fibrillas de colágeno, entre el colágeno y los proteoglicanos, y en la sustancia de proteoglicanos que rodea las fibras de colágeno. Este efecto induce la compactación del estroma corneal, reduciendo el espacio para la acumulación de líquido en córneas edematosas. En oftalmología veterinaria hay varios estudios que abogan por su uso en queratopatías bullosas secundarias a la distrofia corneal.^{29,30} El tratamiento definitivo es el trasplante corneal, mediante el cual se reemplaza la totalidad del endotelio (siempre y cuando el tejido donante sea fresco), o bien el uso de queratoprótesis ("córneas artificiales"), aunque el uso de estas últimas se realiza de momento de forma experimental.^{36,37}

En la DEC el edema corneal es intenso y las bullas epiteliales pueden producir úlceras dolorosas

Distrofia polimórfica posterior

Definición, incidencia y signos clínicos

La Distrofia Polimórfica Posterior (PPD) fue descrita por primera vez en oftalmología humana como una enfermedad autosómica dominante³⁸ sin predisposición racial, sexual o geográfica.³⁹ Se trata de una enfermedad poco frecuente que se presenta en la edad adulta, es en muchos casos asintomática y se caracteriza por alteraciones en el endotelio corneal y la membrana de Descemet. Se pueden observar opacidades polimórficas (algunas de ellas vesiculares), lesiones amplias geográficas y bandas anchas en la membrana de Descemet. Suele ser bilateral, pero puede presentarse de forma asimétrica e incluso en algunos casos de manera unilateral, y los pacientes no suelen desarrollar edema ni neovascularización.³⁹ La PPD puede asociarse a otros hallazgos intraoculares tales como adhesiones iridocorneales, lenticono anterior y glaucoma.^{40,41}

En veterinaria, esta enfermedad se ha diagnosticado recientemente en el Cocker Spaniel Americano, en el que también se ha sugerido un modelo de herencia autosómica dominante.²⁷ Afecta a animales de entre 1 a 7 años de edad y la clínica es extremadamente similar

a la descrita en el ser humano: opacidades corneales posteriores multifocales, no pigmentadas y vesiculares o lineales. Estas lesiones son también bilaterales y se limitan al endotelio o la membrana de Descemet, sin alteraciones del estroma o del epitelio, y sin signos de enfermedad del segmento anterior.

Diagnóstico, tratamiento y pronóstico

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza también mediante biomicroscopía y microscopía especular. Con biomicroscopía se pueden observar vesículas lineales o múltiples en la córnea posterior que no albergan fluidos en el interior. Estas lesiones pueden rodearse por un halo grisáceo. También pueden observarse bandas en la membrana de Descemet. Histológicamente se ven cambios en las células endoteliales, estando algunas de ellas atenuadas, degeneradas o incluso ausentes. En la microscopía especular pueden apreciarse células endoteliales anormales, más grandes de lo habitual, con opacidades intracelulares. Algunas áreas presentan células degeneradas, mientras que otras simplemente presentan menor densidad celular, pero en todos los casos las células que rodean la lesión son completamente normales. Al contrario que en la distrofia endotelial corneal, en la PPD no hay edema corneal.²⁷

En veterinaria los casos descritos no han requerido tratamiento quirúrgico hasta el momento y se han logrado controlar mediante el uso de sustancias hiperosmóticas tópicas de forma crónica y con un buen pronóstico para la visión.²⁷

Degeneración endotelial senil

Definición, incidencia y signos clínicos

La degeneración endotelial senil (DES) es una enfermedad que cursa con diferentes grados de edema corneal sin otros signos asociados, en pacientes de edades avanzadas. Se trata de una enfermedad de evolución muy progresiva y sin predilección sexual.

La densidad celular endotelial disminuye con la edad en todas aquellas especies animales que no tienen capacidad de replicación endotelial. De forma similar, la capacidad funcional de la bomba endotelial también se ve alterada con el curso de los años.⁴² Ambos procesos por sí solos no deberían producir sintomatología clínica alguna si partimos de una densidad endotelial adecuada.

En oftalmología humana hay escasa bibliografía sobre la degeneración endotelial senil (DES) y, en la mayoría de casos, se ha asociado a cirugías intraoculares o a glaucoma. La suma de la disminución de la densidad

celular endotelial con el paso de los años, la reducción en la función de la bomba (también de forma fisiológica) y cualquier otro factor externo que pueda inducir la muerte de las células endoteliales podría explicar la aparición de este edema en pacientes de edad avanzada.⁴³

Algunos perros viejos (más de 8 años de edad) también desarrollan, sin motivo aparente, edema corneal difuso de diferente grado que puede afectar a la totalidad de la superficie corneal. Desafortunadamente, hoy por hoy, no hay estudios sobre la DES en veterinaria. Los autores del presente trabajo han observado que la mayoría de los perros con edema corneal difuso asociado a la edad no tienen historia de enfermedades oculares previas ni han sido sometidos a cirugías intraoculares. Así, hipotetizan que estos animales podrían haber nacido con una densidad celular situada en el rango bajo de lo que se considera normal y que, con la pérdida de células endoteliales que se produce a lo largo de la vida, acaben llegando al límite crítico en el cual se produce descompensación corneal en una edad avanzada (a diferencia de la distrofia endotelial, en la que la sintomatología clínica aparece en edades tempranas). Esta hipótesis es compatible con un cuadro de distrofia endotelial de aparición tardía. Son necesarios estudios clínicos que confirmen la presente hipótesis.

Los pacientes con PPD no suelen presentar edema ni neovascularización

Algunos estudios clínicos que confirmen la presente hipótesis.

Diagnóstico, tratamiento y pronóstico

De manera empírica, los autores del presente artículo tratan inicialmente a los pacientes diagnosticados de DES con agentes hiperosmóticos tópicos. En casos graves, el tratamiento quirúrgico sería idéntico al descrito previamente para la DEC, pudiendo optar por técnicas de tratamiento paliativo o curativo.

Endoteliopatías secundarias en el perro

Algunos procesos que afectan al endotelio corneal pueden deberse a enfermedades oculares localizadas en otros tejidos oculares que alteran de forma secundaria al endotelio corneal, tales como uveítis, glaucoma o luxación de cristalino. También se han descrito lesiones endoteliales tras cirugías intraoculares o en enfermedades como diabetes *mellitus* o hepatitis infecciosa canina.

Uveítis anterior

En el caso de la uveítis anterior, la inflamación intraocular aumenta la permeabilidad del endotelio y disminuye la actividad de la bomba endotelial.⁴⁴⁻⁴⁷ La uveítis, además, se ha asociado a pérdida de densidad

celular, y aumento de pleomorfismo y polimegatismo. Es común, también, observar precipitados queráticos y “blebs” endoteliales, manifestándose estos últimos como zonas oscuras en el patrón endotelial que se corresponden con vacuolas intercelulares llenas de fluido que separan las células endoteliales. Los “blebs” se han asociado a estrés endotelial y, en inflamaciones crónicas y/o recurrentes, pueden dar lugar a descompensación corneal.⁴⁷

Glaucoma

El glaucoma se asocia frecuentemente a edema corneal, siendo la compresión directa del endotelio el mecanismo patogénico más probable.⁴⁸ Estudios experimentales han demostrado cambios morfológicos del endotelio corneal, así como disminución de la densidad endotelial tras cuadros agudos de hipertensión ocular.⁴⁸ El mecanismo patogénico en estos casos se ha subdividido en dos fases: en la primera, se afecta la bomba endotelial y en la segunda, se producen daños celulares (rupturas, hinchazón de mitocondrias, desorganización del retículo endoplasmático y aparición de cuerpos mielínicos).⁴⁹ Además, se ha sugerido que un retraso en el inicio del tratamiento del glaucoma podría causar daños endoteliales irreversibles (hipoxia).⁵⁰

Entre los fármacos destinados a tratar el glaucoma cabe destacar los inhibidores de la anhidrasa carbónica. Este enzima, aparte de mediar la formación del humor acuoso, tiene un papel importante en el control de la bomba endotelial, por lo que su supresión se ha asociado a aumento del edema corneal en algunos casos. Clínicamente el uso de inhibidores de la anhidrasa carbónica tópicos no debería afectar las córneas normales, presumiblemente porque llega poca concentración a la superficie endotelial. Sin embargo, los inhibidores de la anhidrasa carbónica pueden producir edema corneal en córneas que *per se* presenten densidad endotelial baja, lo que sugiere que hay un umbral de reserva de la actividad de este enzima o que la inhibición de su actividad tiene mayor impacto cuando otros elementos del endotelio (por ejemplo, la función de barrera) están comprometidos.⁵¹

Luxación anterior de cristalino

La luxación anterior de cristalino se ha asociado clínicamente con edema corneal difuso. Este edema se ha caracterizado principalmente en medicina humana, donde la microscopía especular en pacientes con síndrome de Marfan, enfermedad hereditaria que cursa con laxitud del tejido conectivo, ha evidenciado gotas endoteliales, pleomorfismo celular, puntos negros en

el patrón endotelial y células anormales.⁵² El contacto directo del cristalino con el endotelio parece ser la causa más probable del daño endotelial y de la aparición del edema.⁵³ Este edema puede mejorar clínicamente con el tiempo, aunque en la mayoría de los casos pueden quedar secuelas postquirúrgicas.

Cirugías intraoculares: facoemulsificación y extracción extracapsular del cristalino

Cualquier traumatismo directo sobre el endotelio, quirúrgico o no, puede inducir una reducción de la densidad celular endotelial. Tanto en personas como en el perro, la facoemulsificación se ha asociado a reducción variable de la densidad endotelial.^{54,55} La alteración sobre el endotelio ha demostrado ser más severa tras una cirugía de extracción extracapsular de cristalino convencional o intracapsular de cristalino.⁵⁴ Algunos autores apuntan a que el daño endotelial puede asociarse a algunos factores tales como el instrumental, la manipulación del núcleo del cristalino, la potencia de los ultrasonidos y la duración de la facoemulsificación.⁵⁶

Diabetes mellitus

La diabetes *mellitus* puede afectar a prácticamente todas las estructuras del ojo, incluido el endotelio corneal. En esta capa se ha descrito aumento del polimegatismo y pleomorfismo⁵⁷⁻⁵⁹ produciendo edema corneal en estadios avanzados. Si los niveles de glucemia son prolongados, puede llegar a reducirse la densidad endotelial y aumentar el área celular media. Se ha sugerido reducir el edema corneal mediante el uso tópico de inhibidores de la aldosa reductasa, como el sorbinilo.^{57,58}

Endotelitis canina por adenovirus o enfermedad del ojo azul

Definición, incidencia y signos clínicos

El adenovirus canino de tipo 1 (CAV1) es el agente causal de la hepatitis infecciosa canina. Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Rubarth en 1947, denominándose inicialmente Enfermedad de Rubarth.⁶⁰ El primer contacto con el agente viral se produce por orina, saliva o secreciones respiratorias y tras un periodo de incubación de 4 a 7 días, los animales infectados pueden mostrar desde signos respiratorios leves – sobre todo aquellos infectados por el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) – a signos de enfermedad sistémica grave (CAV1). En infecciones por CAV1 el virus se replica inicialmente en linfonodos y amígdalas para acabar extendiéndose a otros tejidos con predilección

Numerosas enfermedades oculares y sistémicas pueden alterar el endotelio produciendo edema

por el parénquima hepático, el endotelio vascular y el sistema reticuloendotelial. La sintomatología más frecuente incluye hepatomegalia, ictericia y hemorragias que pueden llevar, en algunos casos, a coagulación intravascular diseminada. Los signos oculares suelen manifestarse en el 20 % de los casos de infección natural.⁶¹ Estas lesiones suelen presentarse de 1 a 3 semanas después de la infección, son unilaterales e incluyen principalmente edema corneal severo (la infección, de hecho, también se denomina enfermedad del ojo azul). El edema corneal comúnmente aparece en la zona límica, pudiendo permanecer focal o bien extenderse a toda la córnea (presentación más frecuente). El cambio de coloración ocular producido por el edema es el signo clínico ocular más fácilmente identificable por el propietario, pudiendo o no presentarse asociado a uveítis anterior. Menos frecuentemente, algunos perros pueden mostrar signos bilaterales (10-30 % de los casos).⁶²

La prevalencia de la enfermedad ha disminuido considerablemente gracias a la vacunación obligatoria, por lo que hoy en día se diagnostican muy pocos casos de infección natural por CAV1. La vacunación inicial con cepas vivas de CAV1 se asoció a incidencias elevadas de signos oculares idénticos a los previamente descritos en la enfermedad natural (enfermedad del ojo azul) (0,4 %).⁶³ La elevada incidencia de reacciones postvacunales hizo optar por cepas atenuadas de CAV2 como estímulo antigénico. Gracias a estas cepas se redujeron marcadamente las reacciones vacunales, pero aún hoy en día se producen de forma esporádica.⁶² Los signos oculares suelen presentarse de 1 a 3 semanas después de la vacunación, y son idénticos a los producidos por la infección natural con CAV1. A pesar de no haber descripciones bibliográficas sobre la incidencia de lesiones oculares en animales infectados de forma natural con CAV2, los autores han diagnosticado recientemente lesiones oculares en pacientes jóvenes, aún no vacunados y diagnosticados de tos de las perreras (CAV2) (información no publicada).

Los signos oculares, tanto en infecciones naturales como en reacciones vacunales, se asocian a una reacción de hipersensibilidad de tipo 3 o reacción de Arthus (antígeno-anticuerpo). El antígeno vírico se ubica en las células corneales endoteliales desde donde provoca la activación de la cascada inflamatoria de la cá-

mara anterior que induce la formación de anticuerpos que, una vez unidos a los antígenos, formarán inmunocomplejos que serán fagocitados por células inflamatorias de respuesta aguda (neutrófilos).⁶⁴

Debido a que la mayoría de animales afectados son jóvenes y aún presentan cierta capacidad regenerativa del endotelio, el edema puede ser transitorio, permaneciendo únicamente durante 2 o 3 semanas. Sin embargo, en otros casos el edema puede ser permanente o tardar meses en desaparecer, sobretodo en el Lebrél Afgano en el que se ha descrito un mayor porcentaje de aparición de lesiones oculares asociadas a CAV1, probablemente por una mayor susceptibilidad.⁶³

Diagnóstico, tratamiento y pronóstico

El diagnóstico se realiza en base a la clínica, en la mayoría de casos asociando un cuadro ocular compatible con historia de infección o vacunación reciente en un animal joven. El diagnóstico definitivo precisa de inmunohistoquímica y/o PCR.

El tratamiento de los animales afectados consiste en la administración de sustancias hiperosmóticas tópicas y antiinflamatorios esteroideos para el control de la inflamación intraocular. En algunos casos se recomienda la administración de midriáticos de corta duración para evitar sinequias posteriores secundarias a la inflamación del segmento anterior.⁶³ El pronóstico varía de forma individual, pudiendo recuperarse totalmente sin secuela alguna o dejar diferentes grados de edema y fibrosis corneal que pueden afectar la agudeza visual.

Conclusiones

El endotelio corneal juega un papel vital en el mantenimiento del estado de deshidratación parcial de la córnea, siendo imprescindible para preservar la transparencia corneal. Puede afectarse por enfermedades primarias y secundarias, que en la mayoría de los casos pueden diagnosticarse mediante examen oftalmológico completo y microscopía especular.

A pesar de que las endoteliopatías presentan asombrosas similitudes entre humanos y animales, en estos últimos no han sido tan ampliamente descritas. Por lo tanto, el estudio del endotelio corneal y sus enfermedades en animales sigue siendo una tarea pendiente.

Fuente de financiación: este trabajo no se realizó con fondos comerciales, públicos o del sector privado.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Summary

The corneal endothelium is a monolayer of polygonal cells on the inner surface of the cornea, in direct contact with the aqueous humor. This layer governs fluid and solute transport across the cornea and preserves corneal transparency. Common primary disorders of this layer include corneal endothelial dystrophy, posterior polymorphous dystrophy and senile endothelial degeneration. Several causes can lead to secondary disorders of the endothelium such as ocular diseases (anterior uveitis, glaucoma...) or systemic diseases (diabetes, infectious canine hepatitis...). Any disturbance of the corneal endothelium will result in different degrees of diffuse corneal edema. Therefore, knowledge of the underlying cause is required in order to establish the proper treatment and prognosis of the disease.

Bibliografía

- Samuelson DA. Ophthalmic anatomy. En: Gelatt KN, editor. *Veterinary Ophthalmology*. Iowa: Wiley-Blackwell; 2013. p. 39-170.
- Gwin RM, Lerner I, Warren JK, Gum G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Invest Ophthalmol Vis Sci ARVO* 1982;22(2):267-71.
- La Rosa FA, Gross RL, Orengo-Nania S. Central corneal thickness of Caucasians and African Americans in glaucomatous and nonglaucomatous populations. *Arch Ophthalmol Am Med Assoc* 2001;119(1):23.
- Montiani-Ferreira E, Petersen-Jones S, Cassotis N, Ramsey DT, Gearhart P, Cardoso E. Early postnatal development of central corneal thickness in dogs. *Vet Ophthalmol* 2003;6(1):19-22.
- Landers JA, Billing KJ, Mills RA, Henderson TR, Craig JE. Central corneal thickness of indigenous Australians within Central Australia. *Am J Ophthalmol* 2007;143(2):360-2.
- 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):222-6.
- Coyo N, Peña MI, 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* 2016;19(5):367-72.
- Merindano M, Costa J, Canals M, Potau J. A comparative study of Bowman's layer in some mammals: relationships with other constituent corneal structures. *Eur J Anat* 2003;6(3):133-40.
- 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):1778-85.
- Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye (Lond)* 2003;17(8):912-8.
- Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res* 2012;95(1):2-7.
- Watsky MA, Olsen TW, Edelhauser HE. Cornea and sclera. En: Tasman W, Jaeger EA, editors. *Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology*. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1995. p. 1-29.
- Kafarnik C, Fritsche J, Reese S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Vet Ophthalmol* 2007;10(4):222-30.
- Murphy C, Alvarado J, Juster R, Maglio M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25(3):312-22.
- Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye* 1990;4(3):389-424.
- Berliner ML. *Biomicroscopy of the eye: Slit lamp microscopy of the living eye*. New York: Hafner Publishing; 1966.
- Vogt A. Die Sichtbarkeit des lebenden Hornhautendothels im Lichtbüschel der gullstrandschen Spaltlampe. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 1919;63:233-4.
- McCarey BE, Edelhauser HE, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea* 2008;27(1):1-16.
- Stapleton S, Peiffer Jr RL. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. *Am J Vet Res* 1979;40(12):1803.
- Yee RW, Edelhauser HE, Stern ME. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Exp Eye Res* 1987;44(5):703-14.
- Kulkarni A, Aasuri M, Satish G. Endothelial evaluation including its role in refractive surgery. En: Agarwal S, Agarwal A, Apple D, editors. *Textbook of Ophthalmology*. New Delhi: Jaypee Brothers Publishers; 2002. p. 971-9.
- Fuchs E. Dystrophia epithelialis corneae. *Abbr von Graefes Arch für Ophthalmol* 1910;76(3):478-508.
- Borboli S, Colby K. Mechanisms of disease: Fuchs' endothelial dystrophy. *Ophthalmol Clin North Am* 2002;15(1):17-25.
- Eghrari AO, Gottsch JD. Fuchs' corneal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol* 2010;5(2):147-59.
- Martin C, Dice P. Corneal endothelial dystrophy in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982;18:327-36.

26. Genetics Committee of the American College of Veterinary Ophthalmologists. Ocular disorders presumed to be inherited in purebred dogs. 7th ed. American College of Veterinary Ophthalmologists, editor. 2014.
27. Cooley PL, Dice PF. Corneal dystrophy in the dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990;20(3):681-92.
28. Ledbetter EC, Gilger BC. Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. En: Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ, editors. *Veterinary Ophthalmology*. 5th ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2013. p. 976-1049.
29. Pot SA, Gallhöfer NS, Walsler-Reinhardt L, Hafezi F, Spiess BM. Treatment of bullous keratopathy with corneal collagen cross-linking in two dogs. *Vet Ophthalmol* 2015;18(2):168-73.
30. Famose F. Evaluation of accelerated corneal collagen cross-linking for the treatment of bullous keratopathy in eight dogs (10 eyes). *Vet Ophthalmol* 2016;19(3):250-5.
31. Bower KS, Trudo EW, Ryan DS, Sia RK, Mines MJ, Stutzman RD, et al. Photorefractive keratectomy in posterior polymorphous dystrophy with vesicular and band subtypes. *J Cataract Refract Surg* 2011;37(6):1101-8.
32. Sella R, Rootman D, Bahar I. Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty for posterior polymorphous corneal dystrophy in an 8-month-old boy. *J Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2013;17(1):94-6.
33. Michau TM, Gilger BC, Maggio F, Davidson MG. Use of thermokeratoplasty for treatment of ulcerative keratitis and bullous keratopathy secondary to corneal endothelial disease in dogs: 13 cases (1994-2001). *J Am Vet Med Assoc* 2003;222(5):607-12.
34. Ortiz J, Lisboa C, Brito F, Martins B. Superficial keratectomy and 360o conjunctival flap for bullous keratopathy in a dog: a case report. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 2011;63(3):773-7.
35. Guerreiro C, Lowe R. A novel surgical approach to canine bullous keratopathy. Proceedings of the 44th Annual ACVO Conference. Puerto Rico: American College of Veterinary Ophthalmologists; 2013. p. 154.
36. Allgoewer I, McLellan GJ, Agarwal S. A keratoprosthesis prototype for the dog. *Vet Ophthalmol* 2010 13(1):47-52.
37. Isard P-E, Dulaurent I, Regnier A. Keratoprosthesis with retrocorneal fixation: preliminary results in dogs with corneal blindness. *Vet Ophthalmol* 2010;13(5):279-88.
38. Koeppe L. Klinische Beobachtungen mit der Kernspaltlampe und dem Hornhautmikroskop. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1916;92(3):341-420.
39. Kiel J. Posterior polymorphous dystrophy. *Clin Exp Optom* 1999;82(1):20-2.
40. Weisenthal R, Krachner J. Posterior polymorphous corneal dystrophy. En: Cavanagh D, editor. *The cornea: Transactions of the World Congress on the Cornea III*. New York; 1988. p. 457-66.
41. Rosa JM da S, Andrade Sobrinho MV de, Lipener C. Contact lens fitting in a patient with Alport syndrome and posterior polymorphous corneal dystrophy: a case report. *Arq Bras Oftalmol* 2016;79(1):42-3.
42. Wigham CG, Hodson SA. Physiological changes in the cornea of the ageing eye. *Eye (Lond)* 1987;1 (Pt 2):190-6.
43. Kaufman HE, Katz JL. Pathology of the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16(4):265-8.
44. Olsen T. Transient changes in specular appearance of the corneal endothelium and in corneal thickness during anterior uveitis. *Acta Ophthalmol* 1981;59(1):100-9.
45. Macdonald JM, Geroski DH, Edelhauser HF. Effect of inflammation on the corneal endothelial pump and barrier. *Curr Eye Res* 1987;6(9):1125-32.
46. Brooks AM, Grant G, Gillies WE. Differentiation and assessment of corneal endothelial changes associated with diseases of the anterior segment of the eye. *Aust N Z J Ophthalmol* 1987;15(1):65-70.
47. Pillai CT, Dua HS, Azuara-Blanco A, Sarhan AR. Evaluation of corneal endothelium and keratic precipitates by specular microscopy in anterior uveitis. *Br J Ophthalmol* 2000;84(12):1367-71.
48. Gagnon MM, Boisjoly HM, Brunette I, Charest M, Amyot M. Corneal endothelial cell density in glaucoma. *Cornea* 1997;16(3):314-8.
49. Melamed S, Ben-Sira I, Ben-Shaul Y. Corneal endothelial changes under induced intraocular pressure elevation: a scanning and transmission electron microscopic study in rabbits. *Br J Ophthalmol* 1980;64(3):164-9.
50. Setälä K. Corneal endothelial cell density after an attack of acute glaucoma. *Acta Ophthalmol* 1979;57(6):1004-13.
51. Sun XC, Li J, Cui M, Bonanno JA. Role of carbonic anhydrase IV in corneal endothelial HCO₃- transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(3):1048-55.
52. Setälä K, Ruusuvaara P, Karjalainen K. Corneal endothelium in Marfan syndrome. A clinical and specular microscopic study. *Acta Ophthalmol* 1988;66(3):334-40.
53. Miller PE. The glaucomas. En: Maggs DJ, Miller PE, Otri R, editors. *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2008. p. 230-57.
54. Gwin RM, Warren JK, Samuelson DA, Gum GG. Effects of phacoemulsification and extracapsular lens removal on corneal thickness and endothelial cell density in the dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24(2):227-36.
55. Bourne RRA, Minassian DC, Dart JKG, Rosen P, Kaushal S, Wingate N. Effect of cataract surgery on the corneal endothelium: modern phacoemulsification compared with extracapsular cataract surgery. *Ophthalmology* 2004;111(4):679-85.
56. Polack FM, Sugar A. The phacoemulsification procedure. II. Corneal endothelial changes. *Invest Ophthalmol* 1976;15(6):458-69.
57. Meyer LA, Ubels JL, Edelhauser HF. Corneal endothelial morphology in the rat. Effects of aging, diabetes, and topical aldose reductase inhibitor treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29(6):940-8.
58. Dañiles MB, Kador PF, Kashima K, Kinoshita JH, Sinha A. The effects of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, on the corneal endothelium in galactosemic dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(11):2201-4.
59. Choo M, Prakash K, Samsudin A, Soong T, Ramli N, Kadir A. Corneal changes in type II diabetes mellitus in Malaysia. *Int J Ophthalmol* 2010;3(3):234-6.
60. Rubarth S. An acute virus disease with liver lesions in dogs (hepatitis contagiosa canis): a pathologico-anatomical and etiological investigation. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1947;suppl 69:1-207.
61. Carmichael L. The Pathogenesis of Ocular Lesions of Infectious Canine Hepatitis: I. Pathology and Virological Observations. *Pathol Vet* 1964;1:73-95.
62. Cullen CL, Webb AA. Ocular Manifestations of Systemic Disease. En: Gelatt K, Gilger B, Kern T, editors. *Veterinary ophthalmology*. 5th ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2013. p. 1897-977.
63. Curtis R, Barnett KC. The "blue eye" phenomenon. *Vet Rec* 1983;112(15):347-53.
64. Carmichael LE, Medic BL, Bistner SJ, Aguirre GD. Viral-antibody complexes in canine adenovirus type 1 (CAV-1) ocular lesions: leukocyte chemotaxis and enzyme release. *Cornell Vet* 1975;65(3):331-51.

Bibliografía

1. Samuelson DA. Ophthalmic Anatomy. In: *Veterinary Ophthalmology* 5th edition (ed. Gelatt K, Gilger BC, Kern T). Wiley-Blackwell: Iowa, 2013; 39–170.
2. Merindano M, Costa J, Canals M *et al.* A comparative study of Bowman's layer in some mammals: relationships with other constituent corneal structures. *Eur J Anat* 2003; 6(3):133–140.
3. Dua HS, Faraj LA, Said DG *et al.* Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* 2013; 120(9):1778–1785.
4. Blumcke S, Morgenroth K. The stereo ultrastructure of the external and internal surface of the cornea. *J Ultrastruct Res* 1976; 18(5):502–518.
5. Jacobsen I, Jensen O, Prause J. Structure and composition of Bowman's membrane. Study by frozen resin cracking. *Acta Ophthalmol* 1984; 62(1):39–53.
6. Wislocki G. The anterior segment of the eye of the rhesus monkey investigated by histochemical means. *Am J Anat* 1952; 91(2):233–261.
7. Wingvist G, Rehbinder C. Fine structure of the reindeer cornea in normal conditions and in keratitis. *Acta Vet Scand* 1973; 14(2):292–300.
8. Rehbinder C, Wingvist G, Roos C. Structure of the cornea in some cervidae. *Acta Vet Scand* 1977; 18(2):152–158.
9. Keller N, Pouliquen Y. Ultrastructural study of posterior cornea in cartilaginous fishes. In: *The Cornea: Transactions of the World Congress on the Cornea III* (ed. Cavanagh H). Raven Press: New York, 1988;153–158.
10. Miller S, Samuelson D, Dubielzig R. Anatomic features of the cetacean globe. *Vet Ophthalmol* 2013; 16(Suppl 1):52–63.
11. Kafarnik C, Fritsche J, Reese S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Vet Ophthalmol* 2007; 10(4):222–230.
12. Gordon M, Foley J, Birk D *et al.* Type V collagen and Bowman's membrane.

- Quantitation of mRNA in corneal epithelium and stroma. *J Biol Chem* 1994; 269(40):24959–24966.
13. Linsenmayer T, Gibney E, Igoe F *et al.* Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol* 1993; 121(5):1181–1189.
 14. Maggs DJ. Cornea and Sclera. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* 4th edition (ed. Maggs DJ, Miller PE, Ofri R). Saunders Elsevier: St. Louis, 2008; 175–202.
 15. Jakus M. Studies on the cornea. II. The fine structure of Descemet's membrane. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2(Suppl 4):243–252.
 16. Tamura Y, Konomi H, Sawada H *et al.* Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32(9):2636–2644.
 17. Smolek M, Klyce S. Cornea. In: *Biomedical Foundations of Ophthalmology* (ed. Wasman W, Jaeger E). J.B. Lippincott: Philadelphia, 1993;1–20.
 18. Gwin RM, Lerner I, Warren JK *et al.* Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; 22(2):267–271.
 19. La Rosa FA, Gross RL, Orengo-Nania S. Central corneal thickness of Caucasians and African Americans in glaucomatous and nonglaucomatous populations. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(1):23–27.
 20. Montiani-Ferreira F, Petersen-Jones S, Cassotis N *et al.* Early postnatal development of central corneal thickness in dogs. *Vet Ophthalmol* 2003; 6(1):19–22.
 21. Landers JA, Billing KJ, Mills RA *et al.* Central corneal thickness of indigenous Australians within Central Australia. *Am J Ophthalmol* 2007; 143(2):360–362.
 22. Franzen AA, Pigatto JAT, Abib FC *et al.* Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in

- enucleated cat eyes. *Vet Ophthalmol* 2010; 13(4):222–226.
23. Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye* 1990; 4(3):389–424.
 24. Morita H. Specular microscopy of corneal endothelial cells in rabbits. *J Vet Med Sci* 1995; 57(2):273–277.
 25. MacCallum DK, Bahn CF, Lillie JH *et al.* Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24(2):247–250.
 26. Hogan M, Alvarado J, Weddell J. The Cornea. In: *Histology of the human eye* 1st edition (ed. Hogan M). W.B. Saunders: Philadelphia, 1971;102–103.
 27. Kreutziger G. Lateral membrane morphology and gap junction structure in rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res* 1976; 23(3):285–293.
 28. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye* 2003; 17(8):912–918.
 29. Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res* 2012; 95(1):2–7.
 30. Watsky MA, Olsen TW, Edelhauser HF. Cornea and sclera. In: *Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology* (ed. Tasman W, Jaeger EA). J.B. Lippincott: Philadelphia, 1995; 1–29.
 31. Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK *et al.* Postnatal development of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27(1):44–51.
 32. Elbaz U, Mireskandari K, Tehrani N *et al.* Corneal Endothelial Cell Density in Children: Normative Data From Birth to 5 Years Old. *Am J Ophthalmol* 2017; 173:134–138.
 33. Murphy C, Alvarado J, Juster R *et al.* Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25(3):312–322.
 34. Andrew SE, Willis AM, Anderson DE. Density of corneal endothelial cells, corneal thickness, and corneal diameters in normal eyes of llamas and alpacas. *Am J Vet Res* 2002; 63(3):326–329.

35. Andrew SE, Ramsey DT, Hauptman JG *et al.* Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *Am J Vet Res* 2001; 62(4):479–482.
36. Laule A, Cable MK, Hoffman CE *et al.* Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol* 1978; 96(11):2031-2035.
37. Blatt HL, Rao GN, Aquavella J V. Endothelial cell density in relation to morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979; 18(8):856–859.
38. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(3):779–782.
39. Doughty MJ. Prevalence of “non-hexagonal” cells in the corneal endothelium of young Caucasian adults, and their inter-relationships. *Ophthalmic Physiol Opt* 1998; 18(5):415–422.
40. Rodrigues G, Laus J, Santos J *et al.* Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Vet Ophthalmol* 2006; 9(2):101–107.
41. Arıcı C, Arslan OS, Dikkaya F. Corneal endothelial cell density and morphology in healthy Turkish eyes. *J Ophthalmol* 2014: 852624.
42. Galgauskas S, Norvydaitė D, Krasauskaitė D *et al.* Age-related changes in corneal thickness and endothelial characteristics. *Clin Interv Aging* 2013; 8:1445–1450.
43. Yee R, Matsuda M, Schultz R *et al.* Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985; 4(6):671–678.
44. Gilger BC, Whitley RD, McLaughlin SA *et al.* Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *Am J Vet Res* 1991; 52(10):1570–1572.
45. Von Sallmann L, Caravaggio LL, Grimes P. Studies on the corneal endothelium of the rabbit. I. Cell division and growth. *Am J Ophthalmol* 1961; 51:955–969.

46. Herbig L, Eule J. Central corneal thickness measurements and ultrasonographic study of the growing equine eye. *Vet Ophthalmol* 2015; 18(6):462–471.
47. Duman R, Tok Çevik M, Görkem Çevik S *et al.* Corneal endothelial cell density in healthy Caucasian population. *Saudi J Ophthalmol* 2016; 30(4):236–239.
48. Hashemi H, Asgari S, Emamian M *et al.* Five year changes in central and peripheral corneal thickness: The Shahroud Eye Cohort Study. *Contact lens anterior eye* 2016; 39(5):331–335.
49. Patel H, Patel D, McGhee C. Identifying relationships between tomography-derived corneal thickness, curvature, and diameter and in vivo confocal microscopic assessment of the endothelium in healthy corneas of young adults. *Eye* 2009; 23(2):270–278.
50. Aghaian E, Choe J, Lin S *et al.* Central corneal thickness of Caucasians, Chinese, Hispanics, Filipinos, African Americans, and Japanese in a glaucoma clinic. *Ophthalmology* 2004; 111(12):2211–2219.
51. Geroski D, Matsuda M, Yee R *et al.* Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology* 1985; 92(6):759–763.
52. Park S, Fong A, Cho H *et al.* Protocol for vital dye staining of corneal endothelial cells. *Cornea* 2012;31(12):1476–1479.
53. Saad H, Terry M, Shamie N *et al.* An easy and inexpensive method for quantitative analysis of endothelial damage by using vital dye staining and Adobe Photoshop software. *Cornea* 2008; 27(7):818–824.
54. Taylor M, Hunt C. 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.
55. Singh G, Böhnke M, Von-Domarus D *et al.* Vital staining of corneal endothelium. *Cornea* 1985; 4(2):80–91.
56. Haguenu F, Hawkes P, Hutchison J *et al.* Key events in the history of

- electron microscopy. *Microsc Microanal* 2003; 9(2):96–138.
57. Tamayo-Arango LJ, Baraldi-Artoni SM, Laus JL *et al.* Ultrastructural morphology and morphometry of the normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural* 2009; 39(1):117–122.
 58. Pigatto JAT, Laus JL, Santos JM *et al.* Corneal endothelium of the Magellanic penguin (*Spheniscus Magellanicus*) by scanning electron microscopy. *J Zoo Wildl Med* 2005; 36(4):702–705.
 59. Melamed S, Ben-Sira I, Ben-Shaul Y. Corneal endothelial changes under induced intraocular pressure elevation: a scanning and transmission electron microscopic study in rabbits. *Br J Ophthalmol* 1980; 64(3):164–169.
 60. Enke P, Rohen J. Morphological studies on the regeneration of rabbit corneal endothelium under the influence of corticosteroids. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1983; 220(1):19–24.
 61. Vogt A. Die Sichtbarkeit des lebenden Hornhautendothels im Lichtbüschel der gullstrandschen Spaltlampe. *Klin Monbl Augenheilkd* 1919; 63:233–234.
 62. Berliner ML. Biomicroscopy of the eye: Slit lamp microscopy of the living eye. New York: Hafner Publishing; 1966.
 63. Mártonyi C. Lamp Examination and Photography. In: *Cornea: fundamentals, diagnosis and management* 3rd edition (ed. Krachmer J, Mannis M, Holland E). Mosby Elsevier: St. Louis, 2010; 89–118.
 64. Maurice D. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia* 1968; 24(11):1094–1095.
 65. Laing R, Sandstrom M, Leibowitz H. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 1975; 93(2):143–145.
 66. Bourne W, Kaufman H. Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. *Am J Ophthalmol* 1976; 81(3):319–323.
 67. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. I.

- Optical principles. *Arch Ophthalmol* 1979; 97(9):1714–1719.
68. McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea* 2008; 27(1):1–16.
 69. Cavanah H, Ladage P, Petroll W *et al*. Clinical specular microscopy. In: *Smolin and Thoft's The Cornea: Scientific Foundations and Clinical Practice* 4th edition (ed. Foster C, Azar D). Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2005; 199–204.
 70. Stapleton S, Peiffer Jr RL. Specular microscopic observations of the clinically normal canine corneal endothelium. *Am J Vet Res* 1979; 40(12):1803-1804.
 71. Sailstad DM, Peiffer RL. Specular microscopic observations of the corneal endothelium in the normal rabbit. *Lab Anim* 1981; 15(4):393–395.
 72. Morita H, Shimomura K, Sakuma Y. Specular microscopy of corneal endothelial cells in cynomolgus monkeys. *J Vet Med Sci* 1994; 56(4):763–764.
 73. Morita H, Shimomura K. Specular microscopy of the corneal endothelial cells in common marmosets. *J Vet Med Sci* 1996; 58(3):277–279.
 74. Bercht BS, Albuquerque L, Araujo AC *et al*. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Vet Ophthalmol* 2015; 18(Suppl 1):137–142.
 75. Albuquerque L, Pigatto JAT, Freitas LV da RP *et al*. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. *Semin Ciências Agrárias* 2015; 36(6Suppl2):4199–4206.
 76. Goldman H. Spaltlampenphotographie und photometrie. *Ophthalmologica* 1940; 98(5–6):257–270.
 77. Minsky M. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* 1988;10:128–138.

78. Featherstone H, Heinrich C. Ophthalmic Examination and Diagnostics. In: *Veterinary Ophthalmology* 5th edition (ed. Gelatt K, Gilger B, Kern T). Wiley-Blackwell: Iowa, 2013; 533–702.
79. Ledbetter E, Irby N, Schaefer D. In vivo confocal microscopy of corneal microscopic foreign bodies in horses. *Vet Ophthalmol* 2014;17(Suppl 1):69–75.
80. Fuchs E. Dystrophia epithelialis corneae. *Albr von Graefes Arch für Ophthalmol* 1910; 76(3):478–508.
81. Vogt A. Weitere Ergebnisse der Spaltlampenmikroskopie des vordern Bulbusabschnittes. *Graefes Arh für Ophthalmol* 1921; 106(1–2):63–103.
82. Friedenwald H, Friedenwald J. Epithelial dystrophy of the cornea. *Br J Ophthalmol* 1925; 9(1):14–20.
83. Elhalis H, Azizi B, Jurkunas U. Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Ocul Surf* 2010; 8(4):173–184.
84. Eghrari AO, Gottsch JD. Fuchs' corneal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol* 2010; 5(2):147–159.
85. Lorenzetti D, Uotila M, Parikh N *et al.* Central cornea guttata. Incidence in the general population. *Am J Ophthalmol* 1967; 64(6):1155–1158.
86. Zoega G, Fujisawa A, Sasaki H *et al.* Prevalence and risk factors for cornea guttata in the Reykjavik Eye Study. *Ophthalmology* 2006; 113(4):565–569.
87. Martin C, Dice P. Corneal endothelial dystrophy in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982; 18:327–336.
88. Huang J, Maram J, Tepelus T *et al.* Comparison of Noncontact Specular and Confocal Microscopy for Evaluation of Corneal Endothelium. *Eye Contact Lens* 2017; doi: 10.1097.
89. Koeppe L. Klinische Beobachtungen mit der Nernstspaltlampe und dem Hornhautmikroskop. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1916; 92(3):341–420.
90. McGee H, Falls H. Hereditary polymorphous deep degeneration of the

- cornea. *AMA Arch Ophthalmol* 1953; 50(4):462–467.
91. Morgan G, Patterson A. Pathology of posterior polymorphous degeneration of the cornea. *Br J Ophthalmol* 1967; 51(7):433–437.
 92. Gupta S, Hodge W. A new clinical perspective of corneal dystrophies through molecular genetics. *Curr Opin Ophthalmol* 1999; 10(4):234–241.
 93. Liskova P, Gwilliam R, Filipec M *et al.* High prevalence of posterior polymorphous corneal dystrophy in the Czech Republic; linkage disequilibrium mapping and dating an ancestral mutation. *PLoS One* 2012; 7(9):e45495.
 94. Kiel J. Posterior polymorphous dystrophy. *Clin Exp Optom* 1999; 82(1):20–22.
 95. Cooley PL, Dice PF. Corneal dystrophy in the dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990; 20(3):681–692.
 96. Grupcheva C, Chew G, Edwards M *et al.* Case Report Imaging posterior polymorphous corneal dystrophy by in vivo confocal microscopy. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001; 29(4):256–259.
 97. Wigham CG, Hodson SA. Physiological changes in the cornea of the ageing eye. *Eye* 1987; 1(Pt 2):190–196.
 98. Olsen T. Transient changes in specular appearance of the corneal endothelium and in corneal thickness during anterior uveitis. *Acta Ophthalmol* 1981; 59(1):100–109.
 99. Macdonald JM, Geroski DH, Edelhauser HF. Effect of inflammation on the corneal endothelial pump and barrier. *Curr Eye Res* 1987; 6(9):1125–1132.
 100. Brooks A, Grant G, Gillies W. Differentiation and assessment of corneal endothelial changes associated with diseases of the anterior segment of the eye. *Aust N Z J Ophthalmol* 1987; 15(1):65–70.
 101. Pillai C, Dua H, Azuara-Blanco A *et al.* Evaluation of corneal endothelium and keratic precipitates by specular microscopy in anterior uveitis. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(12):1367–1371.

102. Gagnon MM, Boisjoly HM, Brunette I *et al.* Corneal endothelial cell density in glaucoma. *Cornea* 1997; 16(3):314–318.
103. Setälä K. Corneal endothelial cell density after an attack of acute glaucoma. *Acta Ophthalmol* 1979; 57(6):1004–1013.
104. Sun XC, Li J, Cui M *et al.* Role of carbonic anhydrase IV in corneal endothelial HCO₃⁻ transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(3):1048–1055.
105. Miller PE. The glaucomas. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* 4th edition (ed. Maggs DJ, Miller PE, Ofri R). Elsevier: St. Louis, 2008; 230–257.
106. Setälä K, Ruusuvaara P, Karjalainen K. Corneal endothelium in Marfan syndrome. A clinical and specular microscopic study. *Acta Ophthalmol* 1988; 66(3):334–340.
107. Gwin RM, Warren JK, Samuelson DA *et al.* Effects of phacoemulsification and extracapsular lens removal on corneal thickness and endothelial cell density in the dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24(2):227–236.
108. Polack FM, Sugar A. The phacoemulsification procedure. II. Corneal endothelial changes. *Invest Ophthalmol* 1976; 15(6):458–469.
109. Meyer LA, Ubels JL, Edelhauser HF. Corneal endothelial morphology in the rat. Effects of aging, diabetes, and topical aldose reductase inhibitor treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29(6):940–948.
110. Datiles MB, Kador PF, Kashima K *et al.* The effects of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, on the corneal endothelium in galactosemic dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(11):2201–2204.
111. Neuenschwander H, Julia C, Wyman M *et al.* Endothelial changes in galactose-fed dogs. *Curr Eye Res* 1995; 14(4):319–322.
112. Choo M, Prakash K, Samsudin A *et al.* Corneal changes in type II diabetes mellitus in Malaysia. *Int J Ophthalmol* 2010; 3(3):234–236.
113. Carmichael L. The Pathogenesis of Ocular Lesions of Infectious Canine

- Hepatitis: 1. Pathology and Virological Observations. *Pathol Vet* 1964; 1:73–95.
- 114.** Cullen CL, Webb AA. Ocular Manifestations of Systemic Disease. In: *Veterinary Ophthalmology* 5th edition (ed. Gelatt K, Gilger B, Kern T). Wiley-Blackwell: Iowa, 2013;1897–1977.
- 115.** Curtis R, Barnett KC. The “blue eye” phenomenon. *Vet Rec* 1983; 112(15):347–353.
- 116.** Carmichael LE, Medic BL, Bistner SI *et al.* Viral-antibody complexes in canine adenovirus type 1 (CAV-1) ocular lesions: leukocyte chemotaxis and enzyme release. *Cornell Vet* 1975; 65(3):331–351.
- 117.** Karai I, Matsumura S, Takise S *et al.* Morphological change in the corneal endothelium due to ultraviolet radiation in welders. *Br J Ophthalmol* 1984; 68(8):544–548.
- 118.** Segarra S, Leiva M, Costa D *et al.* A dose-escalation ex vivo study on the effects of intracameral benzalkonium chloride in rabbits. *BMC Vet Res* 2018; 14(1):39.
- 119.** Reichard M, Hovakimyan M, Wree A *et al.* Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. *Curr Eye Res* 2010; 35(12):1072–1080.
- 120.** LoPinto AJ, Pirie CG, Bedenice D *et al.* Corneal thickness of eyes of healthy goats, sheep, and alpacas manually measured by use of a portable spectral-domain optical coherence tomography device. *Am J Vet Res* 2017; 78(1):80–84.
- 121.** Ribeiro AP, Silva ML, Rosa JP *et al.* Ultrasonographic and echobiometric findings in the eyes of Saanen goats of different ages. *Vet Ophthalmol* 2009; 12(5):313–317.
- 122.** Pigatto JAT, Franzen AA, Pereira FQ *et al.* Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciência Rural* 2009; 39(3):926–929.
- 123.** Collin SP, Collin HB. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clin Exp Optom* 1998; 81(6):245–254.

124. Yee RW, Edelhauser HF, Stern ME. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Exp Eye Res* 1987; 44(5):703–714.
125. Gutiérrez-Ibáñez C, Iwaniuk AN, Lisney TJ *et al.* Comparative Study of Visual Pathways in Owls (Aves: Strigiformes). *Brain Behav Evol* 2013; 81(1):27–39.
126. Sunde P, Bølstad MS, Desfor KB. Diurnal exposure as a risk sensitive behaviour in tawny owls *Strix aluco*? *J Avian Biol* 2003; 34(4):409–418.
127. Pigatto JAT, Cerva C, Freire CD *et al.* Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesqui Veterinária Bras* 2008; 28(9):427–430.
128. Gasser L, Reinhard T, Böhringer D. Comparison of corneal endothelial cell measurements by two non-contact specular microscopes. *BMC Ophthalmol* 2015; 15(1):87.
129. Bayer J. Anatomie des Auges. In: *Tierärztliche Augenheilkunde*. Wilhelm Braumüller: Wien, 1914; 2–82.
130. Schoster J V, Wickman L, Stuhr C. The use of ultrasonic pachymetry and computer enhancement to illustrate the collective corneal thickness profile of 25 cats. *Vet Comp Ophthalmol* 1995; 5:68-73.
131. Cho P, Cheung SW. Central and peripheral corneal thickness measured with the TOPCON specular microscope SP-2000P. *Curr Eye Res* 2000; 21(4):799–807.
132. Faber C, Scherfig E, Prause JU *et al.* Corneal thickness in pigs measured by ultrasound pachymetry in vivo. *Scand J Lab Anim Sci* 2008;35(1):39-43.
133. Henriksson JT, Bron AJ, Bergmanson JPG. An explanation for the central to peripheral thickness variation in the mouse cornea. *Clin Experiment Ophthalmol* 2012; 40(2):174–181.
134. Blackwell WL, Gravenstein N, Kaufman HE. Comparison of central corneal endothelial cell numbers with peripheral areas. *Am J Ophthalmol* 1977; 84(4):473–476.

135. Amann J, Holley GP, Lee S-B *et al.* Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol* 2003; 135(5):584–590.
136. Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Comparison of the corneal endothelium in an American and a Japanese population. *Arch Ophthalmol* 1985; 103(1):68-70.
137. Hashemian MN, Moghimi S, Fard MA *et al.* Corneal endothelial cell density and morphology in normal Iranian eyes. *BMC Ophthalmol* 2006; 6:9.
138. Fuentes F, Sánchez J, Gonzalo G. *Tratado de Etnología Animal: razas de rumiantes y monogástricos* (ed. Diego Marín). Murcia, 2006
139. Padilla MDB, Sibayan SAB, Gonzales CSA. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Filipino eyes. *Cornea* 2004; 23(2):129–135.
140. Sheng H, Bullimore MA. Factors Affecting Corneal Endothelial Morphology. *Cornea* 2007; 26(5):520–525.
141. Moodie KL, Hashizume N, Houston DL *et al.* Postnatal development of corneal curvature and thickness in the cat. *Vet Ophthalmol* 2001; 4(4):267–272.
142. Haider KM, Mickler C, Oliver D *et al.* Age and racial variation in central corneal thickness of preschool and school-aged children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2008; 45(4):227–233.
143. Costantini E, Touzeau O, Gaujoux T *et al.* Age-Related Changes in Central and Peripheral Corneal Thickness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(13):5107.
144. Faragher RG, Mulholland B, Tuft SJ *et al.* Aging and the cornea. *Br J Ophthalmol* 1997; 81(10):814–817.
145. Doughty MJ. The cornea and corneal endothelium in the aged rabbit. *Optom Vis Sci* 1994; 71(12):809–818.
146. Martin G. Regularly Nocturnal Birds. In: *Birds by Night* 1st edition (ed.

- Poyser A). A&C Black Publishers: London, 1990; 103–133.
147. Laing RA, Sanstrom MM, Berrospi AR *et al.* Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Exp Eye Res* 1976; 22(6):587–594.
 148. Evans H, de Lahunta A. The Skeleton. In: *Miller's Anatomy of the Dog* 4th edition (ed. Evans H, de Lahunta A). Elsevier: St. Louis, 2013; 80–157.
 149. Townsend W, Bedford P, Jones G. Abnormal Appearance. In: *Small Animal Ophthalmology: A problem-Oriented Approach* 4th edition (ed. Peiffer R, Petersen-Jones S). Saunders Elsevier: Philadelphia, 2009;67–115.
 150. Kafarnik C, Fritsche J, Reese S. Corneal innervation in mesocephalic and brachycephalic dogs and cats: assessment using in vivo confocal microscopy. *Vet Ophthalmol* 2008; 11(6):363–367.
 151. Barrett P, Scagliotti R, Merideth R *et al.* Absolute corneal sensitivity and corneal trigeminal nerve anatomy in normal dogs. *Prog Vet Comp Ophthalmol* 1991; 1(4):245–254.
 152. Miller P. Lacrimal System. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* 4th edition (ed. Maggs D, Miller P, Ofri R). Saunders Elsevier: St. Louis, 2008; 157–174.
 153. Maggs D. Eyelids. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* 4th edition (ed. Maggs D, Miller P, Ofri R). Saunders Elsevier: St. Louis, 2008; 107–134.
 154. Packer R, Hendricks A, Burn C. Impact of Facial Conformation on Canine Health: Corneal Ulceration. *PLoS One* 2015;10(5): e0123827.
 155. O'Neill D, Lee M, Brodbelt D *et al.* Corneal ulcerative disease in dogs under primary veterinary care in England: epidemiology and clinical management. *Canine Genet Epidemiol* 2017; 4(1):5.
 156. Pumphrey S. Canine Secondary Glaucomas. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2015; 45(6):1335–1364.
 157. Martín-Suárez E, Galán A, Morgaz J *et al.* Comparison of central corneal thickness in dogs measured by ultrasound pachymetry and ultrasound

- biomicroscopy. *Vet J* 2018; 232:13–14.
- 158.** Park Y, Jeong M, Kim T *et al.* Effect of central corneal thickness on intraocular pressure with the rebound tonometer and the applanation tonometer in normal dogs. *Vet Ophthalmol* 2011; 14(3):169–173.
- 159.** Garzón-Ariza A, Guisado A, Galán A *et al.* Diurnal variations in intraocular pressure and central corneal thickness and the correlation between these factors in dogs. *Vet Ophthalmol* 2017;doi:10.111.
- 160.** Wang C, Li A, Pang Y *et al.* Changes in intraocular pressure and central corneal thickness during pregnancy: a systematic review and Meta-analysis. *Int J Ophthalmol* 2017; 10(10):1573–1579.
- 161.** Thuret G, Manissolle C, Acquart S *et al.* Is manual counting of corneal endothelial cell density in eye banks still acceptable? The French experience. *Br J Ophthalmol* 2003; 87(12):1481–1486.
- 162.** Bourne W. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea* 2001; 20(6):560–569.
- 163.** Kwon J, Cho K, Kim H *et al.* Analyses of Factors Affecting Endothelial Cell Density in an Eye Bank Corneal Donor Database. *Cornea* 2016; 35(9):1206–1210.

