

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la citología de impresión corneal en la especie
canina y su aplicación en el diagnóstico de la queratoconjuntivitis seca
(QCS)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mikel Lejarza Illaro

Directores

**Alfonso Rodríguez Álvaro
Elisa Margarita González Alonso-Alegre
Belén Sánchez Maldonado**

Madrid, 2016

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Departamento de Medicina y Cirugía animal



**CARACTERIZACIÓN DE LA CITOLOGÍA DE
IMPRESIÓN CORNEAL EN LA ESPECIE
CANINA Y SU APLICACIÓN EN EL
DIAGNÓSTICO DE LA
QUERATOCONJUNTIVITIS SECA (QCS)**

Mikel Lejarza Illaro

2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL



**CARACTERIZACIÓN DE LA CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN
CORNEAL EN LA ESPECIE CANINA Y SU APLICACIÓN EN
EL DIAGNÓSTICO DE LA QUERATOCONJUNTIVITIS SECA
(QCS)**

TESIS DOCTORAL
MIKEL LEJARZA ILLARO
MADRID, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Dr. Alfonso Rodríguez Álvaro, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Dra. Elisa Margarita González Alonso-Alegre, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Dra. Belén Sánchez Maldonado, Profesora Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización de la citología de impresión corneal en la especie canina y su aplicación en el diagnóstico de la queratoconjuntivitis seca**”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne la calidad y las condiciones científicas necesarias para ser presentada ante el Tribunal correspondiente para su presentación y defensa.

Madrid, 2015

Alfonso Rodríguez Álvaro Elisa González Alonso-Alegre Belén Sánchez Maldonado

A mis aïtas

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias en primer lugar a mis tres directores de tesis, Belén, Elisa y Alfonso, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por apoyarme y animarme siempre.

A todos los compañeros del área de Histología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, a los técnicos de laboratorio y a los profesores, por hacerme sentir uno más del equipo, en especial a Pedro, Vanesa, Fernando, Pilar, Ángeles y Carolina.

A Rafa y a todos los compañeros del animalario del Hospital Clínico Veterinario Complutense por ayudarme siempre con una sonrisa.

A todos mis compañeros de la Clínica Veterinaria La caseta de Madrid por sacar tiempo de sus ratos libres y echarme una mano.

A los internos y residentes del departamento de Medicina y Cirugía del Hospital Clínico Veterinario Complutense por ayudarme cuando lo he necesitado.

A Rosa del Mar Gallú, a Fernando Salas y a todos los clientes del Clínica Veterinaria La Caseta y del Hospital Clínico Veterinario de la UCM que confiaron en mí y me permitieron tomar muestras de sus queridas mascotas.

Agradecer a los miembros del área de apoyo al usuario de los servicios de informática de la Universidad Complutense de Madrid y en especial a Ricardo García por su asesoramiento y su paciencia.

A todos los profesores y compañeros con los que he tenido la suerte de compartir mi tiempo durante estos años de doctorado.

Quiero dar las gracias a toda mi familia y amigos, me siento muy afortunado de poder contar con ellos.

Agradecer en especial a mi ama por su apoyo y amor incondicional (sin ti nada hubiera sido posible) y a mi aita por cuidarme, educarme y aconsejarme; gracias a ti mi vida es mucho mejor. Qué pena no haber compartido más tiempos juntos. Gracias!!.

Y por supuesto a Carmen por quererme y apoyarme en todos mis proyectos. Eres la mejor!

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 5 |
| 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 9 |
| 3.1. Córnea: estructura y función | 11 |
| 3.1.1. Características generales | 11 |
| 3.1.2. Características histológicas de la córnea | 12 |
| 3.1.3. Características estructurales y ultraestructurales del epitelio anterior de la córnea | 14 |
| 3.1.4. Fisiología corneal | 16 |
| 3.1.5. Descamación del epitelio corneal | 17 |
| 3.1.6. Renovación del epitelio corneal | 18 |
| 3.1.7. Reparación y envejecimiento del epitelio corneal | 19 |
| 3.1.8. Reacción del epitelio corneal a la enfermedad | 21 |
| 3.2. Citología de impresión corneal | 22 |
| 3.2.1. Definición y antecedentes históricos | 22 |
| 3.2.2. Aplicaciones clínicas | 24 |
| 3.2.3. Descripción de la técnica | 25 |
| 3.2.3.1. Recogida de muestras | 25 |
| 3.2.3.2. Técnicas de fijación y tinción de las muestras | 28 |
| 3.2.4. Estudio morfométrico en la citología de impresión | 29 |
| 3.2.4.1. Estudio morfométrico de las células corneales de pacientes humanos sanos obtenidas por citología de impresión corneal | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.4.2. Estudio morfométrico de las células corneales de pacientes humanos con patologías de la superficie ocular obtenidas por citología de impresión..... | 30 |
| 3.2.5. Situación actual de la citología de impresión corneal en pequeños animales | 31 |
| 3.2.6. Futuro de la citología de impresión | 33 |
| 3.3. Queratoconjuntivitis seca (QCS)..... | 34 |
| 3.3.1. Diagnóstico de la QCS | 39 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 43 |
| 4.1. Animales incluidos en el estudio | 45 |
| 4.2. Protocolo de exploración oftalmológica..... | 47 |
| 4.3. Criterios de valoración de la superficie ocular | 47 |
| 4.4. Citología de impresión | 49 |
| 4.4.1. Recogida de muestras | 49 |
| 4.4.2. Procesado de las muestras | 53 |
| 4.4.3. Estudio morfométrico de las muestras | 56 |
| 4.5. Estudio estadístico..... | 56 |
| 5. RESULTADOS | 59 |
| 5.1. Resultados obtenidos de la exploración oftalmológica | 61 |
| 5.1.1. Resultados de la prueba lagrimal de Schirmer I (PLS I) | 61 |
| 5.1.1.1. Grupo I | 61 |
| 5.1.1.2. Grupo II | 61 |
| 5.1.2. Análisis de los signos clínicos..... | 62 |
| 5.1.2.1. Grupo I | 63 |
| 5.1.2.2. Grupo II | 63 |

| | |
|---|------------|
| 5.2. Resultados del estudio citológico..... | 64 |
| 5.2.1. Resultados del estudio morfométrico celular..... | 64 |
| 5.2.1.1. Grupo I | 64 |
| 5.2.1.2. Grupo II | 69 |
| 5.2.2. Análisis comparativo de los resultados del estudio morfométrico celular | 74 |
| 5.3. Análisis estadístico | 76 |
| 5.3.1. Estudio comparativo de las medidas celulares entre los ojos derecho e izquierdo de todos los individuos incluidos en el estudio..... | 76 |
| 5.3.2. Estudio comparativo de las medidas celulares entre el grupo I y el grupo II..... | 76 |
| 5.3.3. Correlación entre la PLS I y las medidas celulares del citoplasma, núcleo y ratio N:C | 77 |
| 5.3.4. Correlación entre PLS I y alteraciones celulares..... | 78 |
| 5.3.5. Correlación entre la PLS I y alteraciones celulares en el grupo II según la gravedad de la QCS..... | 80 |
| 6. DISCUSIÓN | 81 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 95 |
| 8. RESUMEN | 99 |
| 9. SUMMARY | 103 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 107 |
| 11. ANEXO | 129 |
| 11.1.Tabla descriptiva de medidas celulares por perro | 131 |

INTRODUCCIÓN

La complejidad de la fisiología corneo-conjuntival asociada a su no menos compleja patogénesis, hace que la homeostasis de la superficie corneal sea frágil. Las consecuencias de las enfermedades que afectan a la superficie externa del ojo son a menudo devastadoras para la visión, por lo que avanzar en el conocimiento de los mecanismos que conducen a la enfermedad corneal adquiere gran significación clínica.

Una de las técnicas empleadas para la detección precoz de enfermedades que afectan a la superficie ocular es la citología de impresión.

La citología de impresión fue introducida en 1977 en la oftalmología de la especie humana. Consiste en la obtención de muestras de epitelio corneal mediante la aplicación de discos de acetato de celulosa directamente sobre la superficie ocular. Permite estudiar las capas celulares más superficiales del epitelio corneal y conjuntival, posibilitando el diagnóstico de un número considerable de trastornos de la superficie ocular y la monitorización de la enfermedad corneal durante y después del tratamiento.

Con gran difusión clínica en medicina humana, por ser una técnica atraumática, mínimamente invasiva, con alta sensibilidad (78-87%) y que puede repetirse a lo largo del tiempo, la citología de impresión puede constituir una herramienta de diagnóstico que supla a la biopsia por escisión y a las técnicas de recogida de muestras de la superficie corneal como los frotis o los raspados.

Aunque son muchas las aplicaciones de la citología de impresión como prueba diagnóstica, la principal en la práctica clínica habitual es el estudio de la metaplasia del epitelio, tanto corneal como conjuntival, en el transcurso de la queratoconjuntivitis seca (QCS). La metaplasia escamosa es un mecanismo de respuesta adaptativa, a menudo reversible, de algunos epitelios ante agresiones externas o estímulos patogénicos del propio organismo. El grado de metaplasia aporta información del estado de la superficie ocular y, por tanto, de la severidad de la enfermedad.

También ha sido utilizada para valorar el grado de recuperación de la superficie corneal en pacientes tratados con trasplante de membrana amniótica, cirugía combinada de ésta con trasplante de limbo en pacientes con insuficiencia limbal, en el diagnóstico de tumores que afectan a la superficie ocular o en el estudio de los efectos de diversas medicaciones tópicas sobre la superficie ocular, entre muchas otras aplicaciones.

Esta técnica, por tanto, podría resultar de gran utilidad en la especie canina, en la que las enfermedades corneales son muy frecuentes. Sin embargo, existen pocos datos publicados que describan las características morfológicas de las células del epitelio corneal obtenidas por citología de impresión en dicha especie.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es realizar un estudio de la citología de impresión corneal canina en animales sanos y compararlo con animales con queratoconjuntivitis seca (QCS), desarrollando para ello los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Normalizar la técnica de obtención y procesamiento de las muestras obtenidas por citología de impresión corneal en la especie canina.
- 2.- Establecer los parámetros morfológicos y morfométricos normales de las células epiteliales corneales obtenidas mediante la citología de impresión corneal en perros sanos.
- 3.- Establecer las alteraciones celulares del epitelio corneal obtenidas mediante la citología de impresión en la QCS en la especie canina.
- 4.- Correlacionar las alteraciones del epitelio corneal con la producción lagrimal valorada mediante la prueba lagrimal de Schirmer I (PLS I) en perros con QCS.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Córnea: estructura y función

3.1.1. Características generales

La pared del globo ocular está constituida por tres capas o túnicas que desde el exterior al interior son: una túnica fibrosa externa, una capa intermedia vascular o úvea y una capa interna nerviosa. La capa más externa o túnica fibrosa está dividida en dos zonas, la córnea y la esclerótica que confluyen en una zona de transición llamada limbo esclerocorneal.⁴³

La esclerótica es una membrana opaca cuya función principal es proporcionar resistencia mecánica al globo ocular para soportar la presión intraocular y proteger a las delicadas estructuras internas del ojo de traumas externos. La córnea posee unas características estructurales únicas que la hacen altamente transparente, por lo que además de la función de soporte que comparte con la esclerótica, constituye la principal lente refractiva del ojo.¹⁵¹

La córnea es un tejido transparente altamente especializado situado en la superficie más anterior del globo ocular. Tiene forma de elipse, con una superficie externa convexa y una superficie interna cóncava, y un diámetro horizontal mayor que el vertical. En el perro y en el gato la diferencia entre estos diámetros es pequeña, haciendo que sus córneas parezcan casi circulares.^{101,213,254}

La ausencia de queratina, vasos sanguíneos y pigmentos en su estructura, y la especial disposición de sus fibras de colágeno permiten a la córnea desempeñar dos de sus funciones principales: la refracción de la luz hacia el eje visual del ojo, con un poder refractivo de 40-42 dioptrías, y la transmisión de la luz dentro del globo, en cantidad y calidad suficientes, para poder formar imágenes nítidas en la retina.⁷⁴

El grosor corneal varía dependiendo de la especie, raza, sexo y edad, siendo más estrecho en las hembras que en los machos, e incrementando su espesor con la edad.^{72,213}

En los cánidos la córnea es más gruesa en el centro, mientras que en los félicos y en los équidos es más gruesa en el limbo. El grosor medio corneal en el perro medido con paquimetría ultrasónica es de $562 \pm 6.2 \mu\text{m}$, mientras que determinado mediante microscopía confocal es de $585 \pm 79 \mu\text{m}$.^{72,101}

La córnea depende del humor acuoso y de la lágrima para su nutrición y limpieza, y de los párpados y membrana nictitante para su protección frente al medio externo.²¹³ La ausencia de queratinización del epitelio se compensa con la presencia de la película lagrimal, que al tapizar la superficie corneal, la lubrica, la protege de agentes infecciosos y forma una interfase con el aire de alta calidad óptica que permite una buena visión.^{202,227}

La película lagrimal está considerada en muchos sentidos la capa más superficial de la córnea. Con un grosor de 7 μm , posee una estructura trilaminar generada por secreciones celulares de estructuras anexas al globo ocular. Su lámina más externa es lipídica y deriva de la secreción de las glándulas de Meibomio; la capa intermedia acuosa, está generada por las glándulas lacrimales situadas en el margen superotemporal de la órbita y en la membrana nictitante; la capa interna mucosa, derivada de las células caliciformes conjuntivales.^{3,58}

Estas capas se entremezclan íntimamente, haciendo muy difícil establecer el grosor de cada una por separado. Estudios recientes incluso sugieren la existencia de sólo dos fases en la película lagrimal; una capa externa formada por lípidos apolares y fosfolípidos, y una más interna, en contacto con el epitelio, formada por un gel acuoso-mucínico, en la que los fosfolípidos se situarían entre las dos fases estabilizando la película lagrimal.^{147, 239}

3.1.2. Características histológicas de la córnea

La córnea es un tejido transparente y avascular altamente especializado. En un corte transversal de la córnea se pueden diferenciar las siguientes capas: el epitelio anterior, la membrana basal, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio.^{43,227}

El epitelio anterior es la capa más externa de la córnea. Es un epitelio plano, estratificado y no queratinizado, cuyas células, dispuestas en tres estratos, presentan características morfológicas similares en todas las especies estudiadas, si bien existen diferencias interespecíficas en cuanto al número de capas celulares.^{28,57,61,71,221}

En cánidos, félidos y aves, el estrato más interno del epitelio corneal presenta una capa simple de células basales, con forma columnar, que descansa sobre una fina membrana basal. El estrato intermedio está compuesto por dos o tres capas de células poliédricas, llamadas células intermedias o aladas (wing cells), y sobre éste se dispone un estrato superficial formado por dos o tres capas de células escamosas no queratinizadas, en contacto directo con la película lagrimal, que presentan numerosas microvellosidades y micropliegues en su superficie.^{76,213}

Las células epiteliales están fuertemente adheridas entre sí a través de moléculas de adhesión (cadherinas e integrinas) y complejos de unión (desmosomas, uniones estrechas y uniones comunicantes) que además tienen un papel de comunicación y formación de barreras. Estas uniones dan estabilidad al epitelio y proporcionan resistencia frente a las agresiones externas.⁵⁸

La membrana basal subepitelial está sintetizada por las células basales epiteliales y sus principales funciones son servir de guía para la migración celular, dar soporte para la adhesión celular, actuar como membrana semipermeable y mantener la arquitectura de los tejidos.

Está constituida por colágeno IV y proteoglicanos asociados a proteínas como la laminina y la fibronectina, cuya función es permitir las interconexiones de los diferentes compartimentos de la matriz extracelular y las uniones celulares.¹¹³

Las células epiteliales basales están fuertemente unidas a la membrana basal gracias a la presencia de numerosos hemidesmosomas. Utilizando microscopía electrónica se pueden distinguir tres láminas diferentes en la membrana basal, que desde el exterior al interior son: una lámina lúcida, una lámina densa y una lámina reticular más interna que está en contacto con el estroma.²²⁷

El estroma o sustancia propia constituye el 90% del espesor de la córnea. Está compuesto por un tejido conjuntivo denso y avascular formado por fibras paralelas de colágeno tipo I y tipo V uniformemente dispuestas en haces o láminas. Las láminas se encuentran separadas entre sí por una matriz extracelular de proteoglicanos y por un sincitio de fibroblastos modificados llamados queratocitos, que se disponen entre las múltiples capas de colágeno.^{64,65,94,115}

La matriz extracelular estromal está formada básicamente por proteoglicanos, en su mayor parte queratán sulfato y dermatán sulfato. Los proteoglicanos se unen a las fibras colágenas de forma ordenada y las rodean individualmente con el fin de mantener su disposición regular en el espacio. Los componentes intersticiales son hidrofílicos y atraen agua de la película lagrimal y del humor acuoso. Cuando se produce un daño en la barrera epitelial o endotelial, el fluido llega al estroma, separando las fibras de colágeno y dando a la córnea una coloración azulada.^{153,220}

El compartimento celular del estroma está formado por fibroblastos modificados o queratocitos que se disponen en las estrechas hendiduras que existen entre los haces paralelos que forman las fibrillas de colágeno constituyendo entre el 3 y el 5% del volumen estromal. Su función consiste en mantener las fibras de colágeno y la matriz extracelular mediante una actividad de síntesis constante. También es posible encontrar en el estrato estromal linfocitos dispersos que migran desde los vasos sanguíneos del limbo corneal.^{64,94,115,195}

La membrana de Descemet es una membrana homogénea y acelular sintetizada por las células del endotelio corneal que se mantiene débilmente unida al estroma. Se extiende hasta el ápex de la red trabecular, situada en la región del limbo corneoescleral. Está compuesta por gran cantidad de glicoproteínas, laminina y colágeno tipo IV, lo que le confiere gran elasticidad y resistencia ante agresiones traumáticas o inflamatorias.^{44,150,213}

Ultraestructuralmente, la membrana de Descemet está formada por tres zonas: una capa anterior de aproximadamente 0.3 μm de grosor próxima al estroma formada por colágeno tipo V y VI, una zona bandeada intermedia de 2 a 4 μm formada por colágeno tipo IV y VIII, y una zona ancha no bandeada interna adyacente al endotelio constituida por colágeno tipo III y IV.²²⁵

El endotelio corneal posterior es la capa más interna de la córnea y está en íntimo contacto con el humor acuoso. Está formado por una única capa de células planas de forma hexagonal que miden de 4 a 6 μm de alto y 20 μm de ancho en el perro adulto.⁴³

Las células endoteliales presentan un citoplasma característico de células con gran actividad metabólica: gran número de mitocondrias, un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico bien desarrollado, y abundantes vesículas de pinocitosis en su interior. Estas estructuras citoplasmáticas les permiten desempeñar funciones de transporte, secreción y síntesis, imprescindibles para la nutrición y el mantenimiento del metabolismo corneal.⁴³

La función principal del endotelio es mantener el estado de deturgescencia o deshidratación corneal relativa. Existen dos mecanismos que impiden el libre flujo de agua y solutos hacia el estroma corneal: el establecimiento de una barrera celular a través de uniones estrechas ("tight junctions") entre células adyacentes y la existencia de un transporte activo a través de bombas de Na^+/K^+ ATPasa ubicadas a lo largo de las membranas laterales celulares.²¹³

La córnea está inervada por los nervios ciliares largos, que derivan de la división oftálmica del nervio trigémino (V par craneal). Estos troncos discurren radialmente a la córnea central formando los plexos anteriores y posteriores en el estroma anterior. Los plexos subepiteliales se extienden hacia el epitelio corneal y sus terminaciones nerviosas carecen de envoltura a este nivel. El epitelio anterior de la córnea está inervado, principalmente, por receptores del dolor, mientras que la mayoría de los receptores de presión están en el estroma.^{74,145,159,213}

3.1.3. Características estructurales y ultraestructurales del epitelio anterior de la córnea

Como se ha citado previamente, el epitelio anterior es la capa más externa de la córnea y se encuentra en íntimo contacto con la película lagrimal precorneal. Es un epitelio escamoso, estratificado y no queratinizado que mide aproximadamente entre 25 y 40 μm de grosor en los carnívoros domésticos.²¹³

En el perro el epitelio anterior está formado por 6 o 7 capas celulares, diferenciándose tres estratos: una capa simple de células basales, 2 o 3 capas de células intermedias o células aladas, y de 2 a 3 capas de células superficiales o células escamosas.²²¹

El estrato basal es la capa más interna del epitelio corneal. Está formado por una capa de células poligonales alargadas, con medidas que oscilan entre los 10 μm de ancho y los 15-20 μm de alto llamadas células basales.²²⁷

Las células basales están unidas entre sí a través de uniones comunicantes ("gap junctions") y desmosomas, y se unen a la membrana basal subepitelial a través de hemidesmosomas.⁸⁹

El citoplasma de las células basales contiene una escasa cantidad de organelas, sin embargo destaca la presencia de un citoesqueleto con abundantes filamentos de actina (que juegan un papel importante en la migración celular), microtúbulos y filamentos de citoqueratina.⁸⁹

El estrato basal cobra especial importancia puesto que a este nivel, en la zona limbal se localizan las células madre progenitoras del epitelio corneal, fundamentales en el proceso de renovación del epitelio corneal.^{122,219}

Las células intermedias o células aladas son células de transición entre las células basales y las células superficiales escamosas. Son células de forma poligonal y un diámetro de 12 a 15 μm . Estructuralmente poseen un citoplasma con escasas organelas y numerosos filamentos de citoqueratina en su citoesqueleto, un gran núcleo ovoide y múltiples interdigitaciones en su superficie.²²⁷ Recubriendo su membrana citoplasmática aparecen numerosos desmosomas que unen firmemente estas células entre sí y con las células basales y superficiales. En las caras laterales de las membranas aparecen también uniones comunicantes ("gap junctions").¹⁰³

Las células superficiales aparecen formando un mosaico de grandes células aplanadas, poligonales, de a 40 a 50 μm de longitud y cuya superficie está cubierta por numerosas microproyecciones citoplasmáticas en forma de microvellosidades y micropliegues cuya función es la de asegurar y fijar la capa mucoide profunda de la película lacrimal precorneal, facilitar la absorción de oxígeno y el transporte de nutrientes entre las células y la película lagrimal.^{47,48,49,50,101,112}

En la membrana citoplasmática de las caras lateral y basal de las células superficiales destacan los complejos de unión intercelulares,¹⁰³ que son de tres tipos:

- Uniones adherentes que garantizan la cohesión mecánica entre las células al tiempo que sirven de punto de anclaje al citoesqueleto y que están integradas por desmosomas y por uniones adherens.
- Las uniones estrechas ("tight junctions"), que aseguran la cohesión celular pero sobre todo representan un sistema estanco que impide el paso libre de moléculas, jugando un papel fundamental en la función de permeabilidad selectiva del epitelio.
- Las uniones comunicantes ("gap junctions"), que permiten el paso de pequeñas moléculas de una célula a otra. Están distribuidas al azar sobre las caras basales y laterales y permiten el acoplamiento metabólico y eléctrico entre las células al permitir el paso de iones y de pequeñas moléculas hidrofílicas.

Son células metabólicamente menos activas que las células subyacentes del mismo estrato, con un citoplasma en el que destaca la escasa presencia de organelas y la gran cantidad de filamentos de citoqueratina y de vesículas secretoras.²²⁷

3.1.4. Fisiología corneal

La transparencia corneal, imprescindible para una correcta visión, se mantiene por la presencia del epitelio escamoso no queratinizado que se ve reforzado por la presencia de una película lagrimal precorneal que tapiza la superficie ocular, la ausencia de vasos sanguíneos y pigmento, la perfecta disposición espacial de las fibrillas de colágeno que forman el estroma corneal y la deshidratación relativa de la córnea, que es mantenida por la barrera endotelial y epitelial.^{85,144,213}

El humor acuoso, la película lagrimal precorneal, el plexo capilar límbico y los capilares conjuntivales palpebrales son los responsables de la nutrición de la córnea, suministrando las cantidades de oxígeno, proteínas y glucosa necesarias para mantener sus elevadas necesidades metabólicas.⁷⁸

El epitelio corneal obtiene la mayor parte de la glucosa procedente del humor acuoso, a través del endotelio y del estroma. La glucosa se almacena en el interior de las células epiteliales en forma de glucógeno que puede ser usado como fuente de energía en condiciones de estrés.⁵⁸

Si las reservas de glucógeno disminuyen, la cicatrización normal del epitelio y la motilidad celular sobre la superficie quedarían comprometidas. El oxígeno lo recibe directamente desde la atmósfera a través de la película lagrimal.⁵⁸

La lágrima posee pocos aminoácidos y la barrera epitelial es impermeable al paso de estas sustancias, por lo que los aminoácidos necesarios para la intensa síntesis proteica fundamental para la renovación corneal se obtienen del humor acuoso a través del endotelio y del estroma.²⁰²

Las necesidades metabólicas de las células del estroma son limitadas y están relacionadas con el mantenimiento de las fibras de colágeno y los glicosaminoglicanos por parte de los queratinocitos.¹⁵³

El mantenimiento de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ endotelial necesaria para conservar la transparencia corneal requiere grandes cantidades de glucosa (aproximadamente cinco veces las del epitelio). Su ruta metabólica principal es la glicolisis anaerobia, empleando de manera significativa también la ruta del ácido cítrico y la ruta de las pentosas fosfato.⁵⁸

3.1.5. Descamación del epitelio corneal

La descamación es el proceso por el cual el epitelio corneal se deshace de las células muertas de manera completa e instantánea sin necesidad de que los macrófagos las fagociten como sucede en otros tejidos.¹⁹⁸

Se han descrito tres mecanismos de descamación de las células de la superficie corneal: la apoptosis clásica, la apoptosis no clásica y la diferenciación terminal.^{62,198,199}

La apoptosis es una forma controlada de muerte celular que puede aparecer de forma fisiológica durante el desarrollo embriológico o en tejidos en crecimiento, pero también es característico de gran cantidad de procesos patológicos como los procesos víricos, las alteraciones inmunológicas producidas por linfocitos T y las lesiones causadas por algunos productos químicos o drogas.¹⁴⁸

La participación de la apoptosis en la descamación fisiológica del epitelio corneal se pone en evidencia por la presencia de células apoptóticas en la superficie epitelial y en las células descamadas. Histológicamente esta apoptosis se reconoce porque las células aparecen retraídas, con la cromatina condensada, el citoplasma fragmentado y restos citoplasmáticos en la superficie (cuerpos apoptóticos). Estas células también se evidencian mediante técnicas inmunocitoquímicas, que ponen de manifiesto el proceso típico de fragmentación del ADN.^{33,199,257}

Estil y su equipo, en un trabajo realizado sobre muestras de superficie corneal humanas, observaron que la mitad de las células descamadas eran apoptóticas desde el punto de vista inmunohistoquímico pero carecían de los cambios morfológicos típicos de la apoptosis clásica. A este tipo de proceso se le ha denominado apoptosis no clásica.⁶²

La existencia de estas células terminalmente diferenciadas, sin las características típicas de la apoptosis clásica, parece ser común a los tejidos que poseen una renovación celular rápida, como sucede en el epitelio del intestino delgado y en los folículos pilosos.^{68,232} Parece que el factor determinante que desencadena este proceso, podría estar relacionado con la tensión y presión ejercida sobre el citoesqueleto celular y la pérdida de interacción entre célula y matriz.^{164,199}

Un tercer mecanismo de descamación epitelial es por desprendimiento de las llamadas células fantasma, que tienen el mismo tamaño que las células de la superficie pero pierden el núcleo antes de descamarse.^{62,199}

3.1.6. Renovación del epitelio corneal

El epitelio corneal en condiciones fisiológicas está sometido a un proceso regenerativo continuo, dado que la vida media de las células epiteliales corneales se estima entre 3 y 7 días. La membrana apical consigue mantener la continuidad de la barrera epitelial durante la descamación fisiológica porque las células descamadas se desprenden solo después de que las células reemplazantes, inmediatamente inferiores, hayan restablecido sus uniones estrechas con las células vecinas.⁵⁶

La renovación del epitelio corneal es un proceso complejo y multifactorial, que depende del correcto funcionamiento y coordinación de múltiples mecanismos interrelacionados entre sí. La alteración del equilibrio entre división, maduración, muerte y descamación celular puede traducirse en patologías de la superficie ocular y en importantes alteraciones visuales.¹³⁸

La regeneración del epitelio corneal está directamente relacionada con el grado de funcionalidad del limbo esclerocorneal, que es la zona donde se localizan las células madre progenitoras del epitelio corneal.^{36,40,118,219} El déficit de estas células produce un cuadro clínico que se caracteriza por una vascularización del epitelio corneal, inflamación crónica, defectos epiteliales persistentes y recurrentes, fotofobia y pérdida de visión, que puede ser más o menos grave dependiendo del número de células madre afectadas.²⁴⁵

Son muchos los autores que han estudiado la renovación del epitelio corneal y han surgido distintas teorías encaminadas a explicar dicho fenómeno.

La teoría actualmente aceptada es la de Schermer, Galvin y Sun, que establece que el proceso de renovación del epitelio corneal se realiza a partir de células madre indiferenciadas o células primordiales (Stem cells) situadas en la capa basal del limbo corneal.²¹⁹

Las células primordiales corneales poseen una serie de características únicas que las diferencia del resto de las células del epitelio corneal:

- Son células escasamente diferenciadas.¹⁹²
- Tienen un ciclo celular lento.^{55,122}
- Poseen una alta capacidad de autorrenovación sin errores y una vida equivalente a la del organismo en el que residen.⁵⁵
- Están en contacto con membranas basales formadas por colágeno tipo IV.²⁰²
- No expresan marcadores específicos del epitelio corneal diferenciado como las citoqueratinas 3 y 12.^{131, 219}
- Realizan movimientos centrípetos de superficie.^{32,55}
- Su deficiencia provoca alteraciones del epitelio corneal tales como vascularización, conjuntivalización e inflamación crónica.^{91,32,117}
- Se ha comprobado que gran parte de los tumores que afectan a la superficie ocular tienen su origen en el limbo esclerocorneal, lo cual coincide con la observación de que los tumores aparecen mayormente en células relativamente poco diferenciadas.¹⁹¹

- Estas células madres indiferenciadas pueden llevar a cabo divisiones celulares asimétricas, originando una célula hija que permanece indiferenciada y otra célula hija destinada a la diferenciación y división celular, llamada célula amplificadora transitoria o célula TAC.^{36,55,118,244}

Las células TAC tienen un potencial proliferativo limitado, se dividen con frecuencia y dan lugar a células diferenciadas incapaces de dividirse. Esta forma de división asimétrica permite tanto la renovación celular como la autoperpetuación de la célula primordial.^{36,55,118,244}

Existe una hipótesis propuesta por Thoft y col. que explica la renovación del epitelio corneal por medio de tres ejes: el eje X representa la proliferación de las células basales, el eje Y corresponde con la proliferación y migración centripeta de las células limbares y el eje Z, que representa la pérdida de células epiteliales de la superficie corneal.²³⁸

El mantenimiento del epitelio corneal, por tanto, puede definirse por medio de la ecuación: $X + Y = Z$, la cual ejemplifica cómo, para mantener el epitelio corneal, la pérdida celular debe estar en equilibrio con el reemplazo celular.²³⁸

3.1.7. Reparación y envejecimiento del epitelio corneal

En la superficie corneal, encontramos unos complejos sistemas de reparación que son el resultado del elevado nivel de organización y diferenciación de estos tejidos. Los mecanismos de reparación se activan de forma inmediata tras la agresión y tienen como misión la reepitelización de la córnea, así como la correcta restauración de su estructura y organización.¹³⁶

Existen dos mecanismos de reparación del área lesionada que permiten mantener el número normal de células epiteliales, la migración de células propias del epitelio anterior y la mitosis celular.²¹³

Si la lesión epitelial es pequeña la reparación se produce por migración en las primeras 24 horas.²¹³

En caso de grandes lesiones existe cierta actividad mitótica, no solo de las células limbares sino también de células del epitelio corneal, que están migrando debido a la excesiva demanda de nuevas células epiteliales.¹⁹⁴

La renovación epitelial se produce cada 7 días, pero ante una erosión o un defecto se inicia una reacción que consiste en tres fases diferentes.

La *fase latente* consiste en un periodo de 4 a 6 horas durante el cual se eliminan los restos celulares, las células se redondean y se reducen los hemidesmosomas del área de la lesión.^{54,222}

La *fase de migración celular*, que dura entre 24 y 36 horas, durante la cual la movilidad celular se acelera y llega a cubrir en poco tiempo la pérdida de sustancia, con la recuperación del efecto barrera, gracias a un incremento de la superficie celular y a la formación de fibrillas y filamentos. Se ha atribuido a la fibronectina un papel fundamental en esta fase, permitiendo una fuerte unión celular con la membrana basal.⁷⁵

En la *fase de proliferación celular* se activan las células primordiales del limbo, se desarrollan los complejos de unión con la membrana basal y se restablecen las terminaciones nerviosas.⁵⁸

La presencia o ausencia de colágeno IV parece determinar respectivamente el carácter inmaduro o diferenciado de las células corneales. El colágeno IV no aparece en la membrana basal de las células corneales de individuos adultos, pero sí aparece en la membrana basal del limbo y de la conjuntiva en el hombre, el conejo y la cobaya. Se cree que el colágeno IV favorece la proliferación epitelial pero hace perder a las células sus propiedades de diferenciación.²⁰²

El fenómeno de envejecimiento afecta también a las células del epitelio corneal que ven disminuidas sus capacidades regenerativas respecto a los epitelios de individuos más jóvenes.²⁰² Sin embargo, la influencia de la edad es difícil de demostrar por la gran variabilidad del índice mitótico del epitelio entre unos individuos y otros de la misma edad, e incluso entre las córneas de un mismo individuo.⁶⁶

Se ha comprobado que los ritmos circadianos también ejercen cierta influencia sobre los procesos que regulan la multiplicación de las células del epitelio corneal. Lavker,⁹¹ en 1991, comprobó en un estudio realizado en ratones y cobayas, que el índice mitótico de las células epiteliales corneales era máximo entre las 6 y las 12 horas de la mañana, coincidiendo con lo observado en otros epitelios estratificados, lo que indica que hay factores sistémicos que determinan esta regulación.

3.1.8. Reacción del epitelio corneal a la enfermedad

La córnea es un tejido avascular y como tal responde ante estímulos nosológicos de un modo diferente a como lo hacen los tejidos que reciben aporte sanguíneo. Para generar una respuesta inflamatoria, la córnea necesita primero adquirir los elementos necesarios para producir la inflamación, mediante la formación de neovasos sanguíneos y la infiltración de células polimorfonucleares desde la lágrima y los vasos sanguíneos del limbo.²²⁷

En el curso de procesos crónicos el epitelio corneal es capaz de desarrollar un mecanismo de respuesta adaptativa, a menudo reversible, llamado metaplasia escamosa. Durante este proceso, la córnea va adquiriendo las características histológicas del epitelio de la piel, tales como la vascularización, la pigmentación subepitelial y la queratinización e hiperplasia epitelial. Este grado de metaplasia aporta información del estado de la superficie ocular, permite establecer un diagnóstico y valorar la progresión y severidad de la enfermedad.^{135,227}

Dependiendo de la naturaleza y de la persistencia de la irritación de la superficie ocular es posible encontrar diferentes cuadros clínicos. No todos los procesos que cursan con metaplasia escamosa presentan todos los cambios citados, así, es posible encontrar una queratinización del epitelio corneal sin que exista pigmentación corneal asociada o metaplasia escamosa sin neovascularización de la córnea.²⁵⁵

En general las lesiones que afectan al epitelio corneal se acompañan de vascularización superficial derivada de los vasos conjuntivales adyacentes.

Las enfermedades que afectan a zonas más profundas de la córnea presentan una vascularización que deriva de la circulación ciliar y se caracteriza por vasos cortos, rectos y de color más oscuro. Si el proceso irritativo se mantiene, la vascularización masiva puede dar lugar a la formación de tejido de granulación.²²⁷

La migración de melanocitos desde los tejidos limbales o perilimbales hasta localizarse en el estroma subepitelial o el epitelio, es un mecanismo de respuesta inespecífica a la inflamación corneal. Constituye una de las causas más frecuentes de déficit visual en animales afectados por enfermedades corneales crónicas, en especial cuando hay exposición o irritación continua de la córnea debido a distiquiasis, triquiasis, rozamiento con los pliegues nasales, exposición corneal crónica en razas braquicéfalas, QCS o queratitis neurotrófica entre otras causas.²²³

3.2. Citología de impresión corneal

3.2.1. Definición y antecedentes históricos

La citología de impresión es una técnica atraumática, simple, rápida y carente de efectos secundarios y contraindicaciones que permite la recolección de las células de las capas más externas de la superficie ocular en pacientes de cualquier especie, mediante la aplicación de un pequeño microfiltro sobre la córnea o la conjuntiva.³⁹

La técnica fue diseñada y descrita por primera vez por Larmande y Timsit en 1954, para el diagnóstico de la metaplasia escamosa de la superficie ocular. En 1977 fue introducida simultáneamente en la práctica clínica por el Dr. Thatcher y col. del hospital Moorfields Eye de Londres y por el Dr. Egbert y col. de la Universidad de Medicina de Stanford (California).^{60,120,236}

Thatcher diseñó la técnica utilizando un disco de impresión de plástico, buscando una alternativa a otros métodos de recogida de muestras de la superficie ocular, menos cómodos para el paciente, como los raspados o los hisopos conjuntivales, con el fin de estudiar la respuesta inflamatoria de la conjuntiva frente a diversas patologías oculares.²³⁶

La técnica que se emplea en la actualidad fue diseñada por Egbert y su equipo, que observaron como al presionar un microfiltro de celulosa sobre la conjuntiva bulbar y palpebral para estudiar la secreción de las células caliciformes, obtenían de manera constante, además de secreciones, abundantes células que se quedaban adheridas al papel.⁶⁰

Las técnicas empleadas para obtener muestras de la superficie corneal se dividen en técnicas invasivas, como la biopsia excisional y los raspados corneales, y en técnicas no invasivas en las que se incluye la citología de impresión y el empleo de hisopos o microcepillos celulares (Cytobrush®).

La biopsia limboconical aporta la ventaja de proporcionar información del estado de todas las capas del epitelio, así como de la organización del estroma corneal. Sin embargo, en muchos casos de enfermedad de la superficie corneal esta técnica no está justificada o está contraindicada debido a que con cada biopsia se reduce potencialmente el número de células madre, lo que puede provocar la conjuntivalización y opacificación de la córnea.^{133,149}

Los raspados realizados con espátulas son ideales para tomar muestras de la córnea y de la conjuntiva de animales muy pequeños, son económicos y el número de células recolectadas es grande; sin embargo, pueden producir lesiones oculares serias si la toma de muestras no se realiza con cuidado o si se realiza a animales muy nerviosos.

Además, la integridad celular se ve comprometida muchas veces y no aporta información de las relaciones intercelulares.¹³

Los frotis realizados con hisopos de algodón son económicos, atraumáticos y tienen la ventaja de proporcionar una gran población celular sin alterar su integridad si se realizan con cuidado. La desventaja es que no aportan ninguna información en lo relativo a las relaciones intercelulares.¹³

El Cytobrush-S® es un microcepillo empleado de modo rutinario para la realización de citologías ginecológicas en medicina humana y ha sido utilizado para obtener muestras de la superficie ocular. Es económico, poco traumático, mantiene bien la estructura celular y el número de células recolectadas es bueno. Sin embargo, debido a su longitud, no es el método más indicado en ojos de pequeño tamaño (cachorros, pájaros, hurones...).^{45,250}

La citología de impresión es una técnica de recolección celular no invasiva, indolora, económica, accesible y fácil de realizar que proporciona de manera constante gran cantidad de células con un alto detalle celular.^{10,81,250}

Permite obtener de una a tres capas de células conjuntivales y una capa de células corneales de la superficie, proporcionando información precisa del área anatómica a estudiar, de la morfología celular, de las relaciones intercelulares y de las interacciones establecidas entre las células epiteliales con otros componentes celulares.^{116,222,233}

La citología de impresión corneal proporciona muestras de la superficie ocular de manera rápida y repetida, permitiendo tanto el diagnóstico como la monitorización frecuente de enfermedades que afecten a la superficie ocular.^{30,39,233,236}

Comparado con las técnicas tradicionales, la citología de impresión ofrece diversas ventajas:

- Preserva mejor la morfología celular que los frotis de la superficie corneal, aportando información más precisa del estado de la superficie ocular y de las relaciones intercelulares.¹³
- Comparada con la biopsia corneal es menos invasiva, tiene menos contraindicaciones, se puede repetir tantas veces como sea necesario y permite obtener muestras más amplias del epitelio corneal sin ocasionar efectos secundarios.^{39,45}
- Con respecto a los microcepillos celulares(Cytobrush®), los resultados han puesto en evidencia que la cantidad de células obtenidas por muestra, la resolución del detalle celular y la valoración de las relaciones intercelulares es mejor aplicando la citología de impresión.^{13,45,250}

- Las muestras obtenidas por citología de impresión pueden ser procesadas y evaluadas por una amplia gama de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas inmunohistoquímicas, citometría de flujo, microscopía óptica o microscopía electrónica entre otras.^{30,39}

Todas estas ventajas han convertido a la citología de impresión en la técnica de elección para el muestreo del epitelio de la superficie ocular y en una herramienta de investigación clínica muy útil.³⁰

Sin embargo, a pesar de tratarse de una técnica sencilla no está estandarizada, lo que ha limitado su reproductibilidad y potencial desarrollo como técnica de referencia en el diagnóstico de patologías de la superficie ocular.^{30,60,141,149}

3.2.2. Aplicaciones clínicas

La citología de impresión ha ido evolucionando desde su aparición en 1954, ampliando sus aplicaciones en el diagnóstico etiológico de diversas patologías de la superficie ocular a medida que se han ido introduciendo nuevos materiales, nuevas tecnologías y nuevas técnicas de laboratorio.

Es una técnica de diagnóstico muy útil, que permite estudiar y comprender los cambios secuenciales que se producen en la superficie corneal y conjuntival durante el curso de la enfermedad ocular, así como evaluar y comparar la eficacia de los tratamientos aplicados para establecer cuál es el más adecuado.¹³⁷

La aplicación más frecuente de la citología de impresión en la práctica clínica es la valoración de la metaplasia escamosa de la superficie ocular en pacientes humanos con xeroftalmia.^{6,21,81,160,161,169,201,204,243,260}

Otras situaciones en las que se emplea la citología de impresión por su alta sensibilidad son:

- En el diagnóstico primario y seguimiento de las neoplasias escamosas de la superficie ocular.^{149,172,180,233,240}
- En el diagnóstico de la insuficiencia limbal y valoración del grado de recuperación de la superficie corneal en pacientes tratados con trasplante de membrana amniótica o cirugía combinada de ésta con trasplante de limbo.^{46,132,133,134,135}
- En el diagnóstico de pacientes con manifestaciones oculares de mucopolisacaridosis, en combinación con microscopía electrónica.¹⁴²
- En el estudio de la toxicidad derivada del uso crónico de medicaciones tópicas utilizadas en el tratamiento de enfermedades oculares como el glaucoma.^{24,186}

- En la valoración de la superficie ocular de pacientes diabéticos, de niños prematuros y de pacientes que usan lentes de contacto.^{2,92,152}
- En estudios sobre la queratoconjuntivitis vernal, el penfigoide cicatricial y la queratoconjuntivitis límbica superior.^{4,166,252}
- En el diagnóstico de queratitis parasitarias por *Acanthamoeba* a partir de la identificación de quistes y trofozoítos en muestras corneales.²¹⁷
- En el diagnóstico de infecciones víricas de la superficie ocular provocadas por herpes simplex, varicela zoster y adenovirus en la conjuntiva de pacientes humanos.²³⁷

3.2.3. Descripción de la técnica

La técnica de citología por impresión de la superficie ocular consta de cinco etapas básicas: recogida de muestras, fijación, tinción, montaje y análisis microscópico.⁴¹

3.2.3.1. Recogida de muestras

La recogida de muestras es técnicamente sencilla, sin embargo existen múltiples factores que pueden influir en la cantidad y calidad de las mismas, como son:

- La aplicación de anestésicos tópicos sobre la superficie ocular previamente a la toma de muestras es motivo de controversia. Algún autor ha sugerido que su empleo podría producir artefactos o alterar la morfología celular,²³⁶ sin embargo, otros autores han defendido que su influencia es mínima.^{60,167}
La gran mayoría de los estudios consultados de citología de impresión de la superficie ocular han empleado anestesia tópica.^{6,10,18,19,41,45,46,51,59,79,160,161,167,196,203,204,205,233,237,240,243}
- Las características de la superficie ocular afectan de manera considerable a la calidad y cantidad de la muestra. La presencia de secreciones mucosas, exudado purulento o lágrimas sobre la córnea disminuye la cantidad de células corneales que se adhieren a la membrana de filtración, por lo que es fundamental mantener la superficie corneal limpia y seca antes de obtener la muestra.
- Las características físicas de la membrana de filtración afectan directamente tanto al número de células recolectadas como al mantenimiento de la estructura morfológica de las mismas. En los diferentes estudios se han empleado diversos tipos de membranas, lo que contribuye a la falta de homogeneidad de la técnica.

Algunos autores han empleado membranas de metilcelulosa²³⁴ o nitrocelulosa,^{21,59} sin embargo, las membranas de filtración de acetato de celulosa MF-Millipore® (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) son las que han sido utilizadas con mayor frecuencia en los estudios consultados.^{6,19,41,45,60,81,84,133,135,141,156,157,160,161,167,182,196,201,203,204,205,233,243}

Están formadas por ésteres mixtos de celulosa hidrofílica y se fabrican con diferentes tamaños de poro.

A partir de 1992 algunos autores empezaron a utilizar una membrana de politetrafluoroetileno hidrofílico llamada Biopore® (Millicell-CM 0.4 µm PICM012550, de Millipore Corporation, Bedford, MA) diseñada originalmente para realizar cultivos celulares. Biopore® posee una serie de propiedades físicas, como la transparencia al hidratarse y la incapacidad de teñirse con pigmentos fluorescentes, que la hacen muy útil para la realización tanto de estudios tradicionales por microscopía óptica, como de estudios en los que se empleen tinciones inmunohistoquímicas o inmunofluorescencia.^{10,18,46,51,237,240}

El tamaño del poro de la membrana de filtración es determinante, afectando tanto a la cantidad de células recolectadas como a la resolución del detalle celular. Así, el empleo de membranas con un tamaño de poro grande proporciona mayor cantidad de células pero con mayores alteraciones estructurales, mientras que tamaños de poro pequeños permiten obtener menor cantidad de células por muestra, pero de gran calidad estructural.¹⁴¹

Los tamaños de poro empleados en los diversos estudios son de 0.025 µm,^{6,167,182} 0.10 µm,⁸¹ 0.20 µm,¹⁰ 0.22 µm,¹⁵⁶ 0.25 µm,⁴⁵ 0.40 µm^{18,46,51,237,240} y 0.45 µm^{19,41,59,133,135,157,160,161,201,203,204,205,233,234}

Martinez, en un intento de estandarizar la técnica, realizó un estudio en conejos en el que comparaba diversas membranas de filtración con diferentes tamaños de poro para ver cuál era el más adecuado para obtener muestras conjuntivales. Atendiendo al número de células obtenidas y al mantenimiento de la morfología celular, llegó a la conclusión de que los mejores resultados se obtenían empleando membranas de filtración de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0.025 µm y 0.22 µm.¹⁴¹

Sin embargo, estudios posteriores han empleado membranas acetato de celulosa con tamaños de poro diferentes a los considerados óptimos por este autor con buenos resultados.^{6,19,41,45,59,81,133,135,160,161,205,233,234}

- Se han encontrado grandes diferencias en cuanto al tamaño de la membrana de filtración utilizado para tomar las muestras también entre los distintos estudios, pudiendo variar desde 3x4 mm,⁵⁹ 3x7 mm,¹⁹ 3x10 mm,¹⁹⁶ 4x3 mm,²⁰³ 4x8 mm,¹⁰ 5x5 mm,^{133,141,157,182,205} 5x7 mm,⁴¹ 5x8 mm,¹⁵⁶ 5x25 mm,²⁰¹ y filtros circulares de 6.2 mm de diámetro.¹⁶⁹ Las membranas Biopore® están precortadas en círculos de 8 mm de diámetro y van unidas a un cilindro de plástico, lo cual facilita su manejo.^{18,46,51,237,240}

- La rugosidad del papel de celulosa es otra característica física que a priori puede influir en el número y calidad de las células obtenidas. El papel de filtro tiene dos caras, una más brillante y lisa, y otra más mate y rugosa.¹⁶⁷ La cara rugosa ofrece mayor área de superficie para la adhesión celular, lo que supone una ventaja sobre la cara lisa. Sin embargo, las células tienden a adaptarse a la superficie del papel por lo que se distorsionan en el papel rugoso, permaneciendo planas y lisas en un papel liso.¹⁴¹

Algunos investigadores como Divani,⁴⁵ Nelson¹⁶⁷ y Haller-Schober,⁸¹ especifican en sus trabajos el empleo de la cara mate y rugosa del papel, sin embargo la mayoría no hace referencia a este respecto. Nelson¹⁶⁷ y Tseng²⁴³ apuntaron que ambas caras pueden ser utilizadas sin afectar a la recogida celular.

- Vadrevu²⁵⁰ determinó la importancia de las propiedades químicas del papel en la toma de muestras al comprobar que el tratamiento de la membrana de celulosa con sustancias químicas, como los surfactantes, reducía notablemente la cantidad de las células recolectadas, por lo que recomendaba emplear siempre filtros libres de surfactante.
- La influencia de las fuerzas electrostáticas del papel de filtro sobre la cantidad de células recolectadas se puso de manifiesto en un estudio realizado por Dursun⁵⁹ en el que valoraba los cambios producidos en la superficie ocular en un grupo de conejos con ojo seco. Determinó que el número de células recolectadas mediante citología de impresión aumentaba espectacularmente si se dejaban las membranas de filtración en agua destilada durante la noche, concluyendo que la pérdida de las fuerzas electrostáticas por parte del papel de celulosa favorecía la recolección celular.
- La presión ejercida sobre el globo ocular durante la toma de muestras es otra variable a tener en cuenta. Martínez¹⁴¹ valoró cuál era la presión óptima que debería ejercerse para obtener la mayor cantidad de células, concluyendo que una presión de 60 G ejercida con un oftalmodinamómetro de Goldman era la ideal.

Sin embargo, la mayoría de autores simplemente describe que una vez el papel de celulosa ha sido apoyado sobre la superficie ocular, se debe ejercer una ligera presión para asegurar la adhesión celular pero sin especificar la cantidad de presión ejercida.

Entre los múltiples instrumentos utilizados para presionar la superficie ocular para obtener la muestra destacan oftalmodinamómetros^{79,141,169,203,222,263} barritas de cristal o plástico^{60,167,182,196,237} y pinzas de cirugía entre otros.^{19,41,81,160,206,233}

Brandao,²³ sin embargo, en un estudio realizado para establecer el patrón celular conjuntival normal en felinos domésticos, obtuvo muestras de calidad sin utilizar ningún instrumento para presionar la membrana sobre la superficie ocular, empleando un método que consistió en evertir los párpados e introducir una tira de papel de filtro en el saco conjuntival durante unos segundos.

- El tiempo de contacto entre el papel y la superficie ocular varía entre unos autores y otros, desde 2 segundos,^{45,79,182,169,203} 2 a 3 segundos,^{59,196} 2 a 4 segundos,²³ 2 a 5 segundos,⁴¹ 3 segundos,^{141,157} 3 a 4 segundos,²⁰⁵ 3 a 5 segundos,^{46,237} 5 segundos,^{19,156} 5 a 10 segundos,²²² 10 a 20 segundos,¹⁴⁹ hasta 30 segundos⁸⁴ sin que ningún autor haya reportado diferencias en la calidad o la cantidad de la muestra derivadas del tiempo contacto entre la superficie ocular y la membrana de filtración.
- Uno de los puntos en los que coincide la mayoría de los autores es el modo de retirar la membrana de la superficie ocular una vez que han contactado. Independientemente del tipo de membrana utilizada y de los instrumentos empleados a tal efecto, siempre se describe como si se intentase despegar el papel de la superficie ocular empezando a levantarlo desde uno de los lados hacia el otro extremo, en un intento de descamar la capa superficial de células adheridas a la membrana.^{19,45,60,77,59,81,141,161,233,243}

3.2.3.2. Técnicas de fijación y tinción de las muestras

Los métodos de fijación de las muestras son diversos y van desde muestras fijadas al aire²³⁷, hasta el empleo de sustancias químicas como etanol de 95°^{19,59,149,167,201,233} etanol de 96°^{6,133,157,160,204,205} etanol de 99°⁵¹ sprays de fijación,^{45,46,79,169} y mezclas de ácido acético glacial con formaldehído al 37% y alcohol etílico de 70° (1:1:20)^{41,141,196,222,243} entre otros.

Las tinciones Ácido Periódico-Schiff (PAS)^{6,19,45,59,60,79,133,156,157,160,161,167,182,203,204,263} y la combinación de PAS y Papanicolau modificadas,^{41,81,141,172,222,233,243} han sido las más empleadas por los diversos autores. Otras tinciones empleadas con buenos resultados en muestras obtenidas de la superficie ocular de pacientes humanos y animales han sido las de Giemsa,^{18,23,234} Ziehl/ Alcian blue,²⁰¹ Shorr²³ o hematoxilina.^{21,51}

3.2.4. Estudio morfométrico en la citología de impresión

Muchas de las patologías que afectan a la superficie ocular provocan metaplasia escamosa del epitelio corneal y conjuntival, lo que se traduce en cambios celulares estructurales y funcionales. Los cambios morfológicos asociados a estas patologías y descritos por citología de impresión son un aumento del tamaño celular, disminución del tamaño nuclear y un aumento del ratio núcleo:citoplasma (ratio N:C), que van asociados a otras alteraciones morfológicas citoplasmáticas o nucleares, más o menos frecuentes en función de la gravedad o cronicidad de la patología.¹⁶¹

La introducción de nuevos equipos de imagen y software informáticos ha facilitado mucho el contaje y medición de las células de la superficie ocular, lo que ha permitido obtener medidas cada vez más precisas y establecer diferencias entre patrones celulares sanos y alterados. Los autores consultados han empleado diversos equipos de imagen para su estudio.

López-García, Rivas y Murube tomaron las medidas de las células de la superficie ocular sobre fotografías de 10x15 cm obtenidas a 40x mediante una cámara fotográfica acoplada a un microscopio óptico.^{133,161}

Blades y Doughty utilizaron fotografías en color de las células a 40x, que fueron impresas superponiendo una escala de 100 μm , y escaneadas para producir láminas de 35 mm por proyección. Estas fotografías fueron graduadas de acuerdo con una escala de cuatro puntos, que evaluaba el tamaño y la forma de las células. Sobre las láminas de 35 mm se dibujaron los márgenes externos de las células y de los núcleos.¹⁷

Doughty, buscando mayor precisión en el establecimiento del tamaño celular empleó una gran hoja de papel en blanco que superpuso sobre las imágenes magnificadas a 3000x para realzar los bordes celulares y a partir de ahí calcular el área, la longitud y la anchura celular.⁵¹

Grene, tras analizar las muestras bajo microscopía óptica, las digitalizó, y empleando programas de gráficos estableció las áreas celulares absolutas y porcentuales, lo que le permitió realizar un mapa topográfico de la superficie conjuntival donde representaba los grados de metaplasia escamosa en pacientes humanos sanos y con síndrome de ojo seco.⁷⁹

3.2.4.1. Estudio morfométrico de las células corneales de pacientes humanos sanos obtenidas por citología de impresión

Existen escasas referencias bibliográficas sobre las medidas morfológicas de las células de la superficie corneal obtenidas por citología de impresión en pacientes sanos que permitan establecer una base comparativa con patrones celulares patológicos para fines diagnósticos.

En 1991, Rivas realizó un estudio de la superficie ocular para describir el patrón normal del epitelio corneal y conjuntival en individuos sanos utilizando la citología de impresión. Observó que en la mayoría de las muestras corneales aparecían láminas de células poligonales con un núcleo central redondo, con cromatina finamente granular, uniformemente distribuida y una delicada membrana nuclear. Describió el citoplasma como abundante, semitransparente y no queratinizado. El tamaño medio de las células epiteliales corneales fue de $56.1 \pm 5.8 \mu\text{m}$ de largo y $37.6 \pm 4.3 \mu\text{m}$ de ancho.²⁰³

En 2002, Murube y Rivas establecieron una clasificación del síndrome de ojo seco basándose en los signos clínicos y en las características celulares de la superficie ocular. Observaron que los individuos con un grado 0 de metaplasia escamosa presentaban un área celular corneal de $300\text{-}350 \mu\text{m}^2$ y un ratio N:C 1:3.¹⁶⁰

En 2003 estos mismos autores realizaron un estudio de la superficie ocular de 33 individuos con el fin de obtener medidas de las células corneales normales. Los individuos con un grado 0 de metaplasia escamosa según su escala de gradación presentaron un área nuclear de $106.4 \pm 10.5 \mu\text{m}^2$, un área celular de $322.41 \pm 34.08 \mu\text{m}^2$ y un ratio N:C de 1:3.¹⁶¹

3.2.4.2. Estudio morfométrico de las células corneales de pacientes humanos con patologías de la superficie ocular obtenidas por citología de impresión

Desde la implantación de la citología de impresión en el estudio de la superficie ocular, diversos autores como Tseng, Nelson, Adams, Aragona, Blades y Oroza entre otros han desarrollado escalas para valorar el grado de metaplasia escamosa de las células de la superficie ocular centrándose principalmente en la conjuntiva, a pesar de que la córnea suele ser la más afectada en pacientes que padecen síndrome de ojo seco.^{1,5,17,161,167,169,179,243}

En 1992, Rivas estudió los cambios morfológicos que se producían en la superficie ocular de personas que padecían QCS. Observó que el tamaño de las células epiteliales corneales era ligeramente mayor que el de las células normales.

El tamaño medio era $61 \pm 7.6 \mu\text{m}$ de largo y $43.2 \pm 7.1 \mu\text{m}$ de ancho. Las células se caracterizaban por tener un citoplasma más abundante y transparente, y un núcleo con la cromatina más condensada que las células control.²⁰⁴

En 2003, Murube y Rivas con objeto de establecer una correlación entre los signos clínicos de pacientes con síndrome de ojo seco y la metaplasia escamosa celular en células corneales y conjuntivales, desarrollaron una clasificación que distingue 6 grados de metaplasia. Los criterios valorados fueron la forma y el tamaño celular, la separación intercelular, el tamaño nuclear, la tinción del citoplasma, las alteraciones nucleares, el ratio núcleo:citoplasma (ratio N:C) y la conjuntivalización del epitelio corneal.¹⁶¹

En 2006, López-García estudió la relación entre el grado de metaplasia escamosa del epitelio corneal y la gravedad clínica de la insuficiencia limbal en pacientes humanos. Los resultados mostraron que en los pacientes que presentaban una insuficiencia limbal asintomática el tamaño celular medio era $477 \pm 140 \mu\text{m}^2$, con un ratio N:C de $1:5,25 \pm 1,5$. Concluyó que existía correlación entre la gravedad clínica de la insuficiencia limbal y el grado de metaplasia escamosa del epitelio corneal, e incluso que pacientes con afectación leve o preclínica presentaban cierto grado de metaplasia escamosa, lo que realizaba la utilidad de la citología de impresión como diagnóstico precoz en casos de insuficiencia limbal.¹³⁵

3.2.5. Situación actual de la citología de impresión corneal en pequeños animales

La citología de impresión corneal y conjuntival no es una técnica diagnóstica habitual en la práctica clínica veterinaria. La mayoría de los estudios en animales han sido realizados de modo experimental en conejos, con el objetivo de extrapolar los datos obtenidos a patologías que afectan a la especie humana.^{59,141}

Hasta el momento son pocos los estudios realizados con citología por impresión de la superficie ocular en pequeños animales, y la mayoría se centran exclusivamente en el estudio de la conjuntiva.

Bounous, en 1998, estudió los cambios producidos en la conjuntiva de 15 perros diagnosticados de QCS antes y después de un tratamiento de 6 semanas con ciclosporina A tópica al 0.2% cada 12 horas. En sus conclusiones defiende la idoneidad del método de citología por impresión para el estudio de la superficie ocular en perros.

Determinó que el grado de metaplasia escamosa de las células conjuntivales era significativamente menor tras el tratamiento con ciclosporina A tópica, aunque el grado de inflamación no mejoraba de manera significativa.²¹

En 2002, Brandao²³ realizó un estudio en 30 felinos domésticos sanos en un intento por establecer el patrón celular normal de la conjuntiva en esta especie. Empleando las tinciones de Giemsa y Schorr, determinó que el patrón normal se caracterizaba por la presencia de células de las capas intermedia y superficial dispuestas en grupos o en sábana, con morfología similar a la descrita por otros autores como Jegou o Malerba que emplearon técnicas de raspado conjuntival.^{95,140}

Bolzan, en 2005, realizó un estudio con 20 perros sanos para establecer el patrón citológico conjuntival normal. Destacó en sus resultados que, aunque las muestras fueron tomadas en conjuntivas sanas, en el 53% de las preparaciones se encontraron hebras de mucosidad, en el 47% se identificaron leucocitos y en el 33% aparecieron células epiteliales queratinizadas, con un citoplasma rosa claro de aspecto granular y con núcleos degenerados o sin núcleos.¹⁹

Tardón,²³⁴ en 2011, realizó un estudio en 28 gatos sanos. Estableció un patrón celular conjuntival normal atendiendo al número de células caliciformes y al tamaño de las células cilíndricas, y un patrón celular corneal empleando como criterio el tamaño de las células escamosas de la superficie. Las células fueron categorizadas de acuerdo a los grados de metaplasia escamosa propuestos por Murube y Rivas.¹⁶¹ Cabe destacar que del total de las células muestreadas, un 10% tanto de la córnea como de la conjuntiva presentaron signos de alteración celular caracterizados por núcleos degradados o picnóticos y citoplasmas queratinizados.

También en 2011, Balicki⁶ realizó un estudio en 18 perros diagnosticados de QCS basándose en los resultados de la PLS I. Dividió a los animales en diferentes grupos en función de los resultados obtenidos con la PLS I y tomó muestras de la conjuntiva y de la córnea. Tras realizar el estudio microscópico de las muestras estableció una correlación entre la gravedad de los signos clínicos, la severidad de los cambios metaplásicos córneo-conjuntivales y los valores obtenidos con la PLS.

A pesar de que la citología de impresión es una técnica complementaria de gran ayuda en el entendimiento de los procesos fisiológicos y patológicos que afectan a la superficie ocular, no hemos encontrado, hasta el momento, ningún artículo en el que se haga un estudio del patrón celular normal en la córnea de los perros.

3.2.6. Futuro de la citología de impresión

La citología de impresión es una técnica versátil y en expansión, lo que le ha permitido evolucionar a lo largo del tiempo desde sus inicios en 1977. Los mayores avances que se han producido en el diagnóstico de patologías oculares por citología de impresión van ligados a la incorporación de nuevos instrumentos de magnificación y de nuevas técnicas laboratoriales.^{60,236}

La introducción de nuevas tecnologías que permiten el estudio de la ultraestructura celular, como la microscopía electrónica de barrido y la microscopía electrónica de transmisión, mucho más potentes que la microscopía óptica, ha supuesto un gran avance en el conocimiento de la patogenia de las enfermedades que afectan a la córnea y a la conjuntiva.^{59,143,183,237}

Paralelamente al desarrollo de nuevos instrumentos de magnificación se han ido incorporando modernas técnicas de laboratorio como la citometría de flujo,^{11,25} las tinciones inmunohistoquímicas e inmunofluorescentes^{10,46,185,237} y la PCR^{35,188,256} entre otras, lo que ha incrementado el potencial de la citología de impresión como método diagnóstico.

La citometría de flujo es una técnica estandarizada cuyos resultados no dependen de la interpretación subjetiva del personal de laboratorio. La combinación de la citometría de flujo con la citología de impresión corneal, permite un estudio objetivo de la superficie ocular, como por ejemplo el número de células HLA-DR positivas, la presencia de factores apoptóticos y otros receptores celulares.¹³⁷

La citología por impresión asociado a las técnicas de RT-PCR/PCR, que permite obtener ADN de células de la superficie corneal, posibilita la identificación de las células limbales supervivientes del donante en casos de trasplantes limbales y la identificación de genes de superficie ocular, como los péptidos defensinas antimicrobianas y las enzimas antioxidantes.^{35,256}

Las tinciones inmunohistoquímicas e inmunofluorescentes unidas a la citología de impresión están posibilitando la identificación de virus que afectan a la superficie ocular de un modo más rápido y con la misma fiabilidad o mayor que las técnicas tradicionales de aislamiento viral a partir de cultivos celulares.²³⁷

La combinación de la citología de impresión y técnicas inmunocitoquímicas que utilizan anticuerpos anti citoqueratinas de la superficie ocular CK19 y CK3, ha demostrado que la identificación de citoqueratinas CK19 específicas de conjuntiva en la córnea es un método precoz para identificar insuficiencias limbales dado que la conjuntivalización de la córnea es un signo diagnóstico de este proceso.^{46,193, 228}

3.3. Queratoconjuntivitis seca

La queratoconjuntivitis seca (QCS), también conocida como enfermedad del ojo seco, síndrome de ojo seco o síndrome de lágrima disfuncional, se define como una enfermedad multifactorial de la película lagrimal y de la superficie ocular que ocasiona síntomas de malestar, trastornos visuales e inestabilidad de la película lagrimal capaz de ocasionar daños en la superficie ocular. Se acompaña de un incremento de la osmolaridad de la lágrima e inflamación de la superficie ocular.^{14,42}

La QCS una patología ocular muy común en la especie canina y uno de los principales motivos de consulta en la clínica oftalmológica veterinaria.

Su diagnóstico está basado en una lectura de la PLS I menor a 15 mm/min, junto con hallazgos patológicos en la superficie ocular tales como descarga ocular mucosa o mucopurulenta, grados variables de conjuntivitis, queratitis pigmentaria, ulceración corneal y ceguera.^{3,107,215}

La QCS puede estar causada por una disminución de la producción lagrimal y/o por la evaporación del componente acuoso de las lágrimas.

Existen diferentes estudios sobre la prevalencia de la QCS en la especie canina. En 1976, Helper⁸⁷ estableció una prevalencia del 0,4% de los perros incluidos en su estudio y en otro informe de 1998, Kaswan documentó una prevalencia de la enfermedad en el 35% de los 460 perros incluidos en el estudio.¹¹⁰

Posteriormente, Williams y su equipo realizaron la PLS I a 1.000 perros seleccionados al azar y observaron que el resultado de la misma era inferior a 10 mm/min en el 4% de los animales.¹⁸⁴

Las razas de perros en las que se ha descrito una predisposición a desarrollar QCS son, entre otras: Cavalier King Charles Spaniel, Bulldog Inglés, Lhasa Apso, Shih Tzu, West Highland White Terrier, Carlino, Sabueso, Cocker Spaniel Americano, Pequinés, Boston Terrier, Schnauzer miniatura y Samoyedo.¹⁰⁷

Entre las múltiples causas implicadas en el déficit del componente acuoso de la lágrima destacan en primer lugar las alteraciones inmunomediadas del tejido glandular lagrimal.

Los hallazgos histopatológicos de los tejidos implicados en la producción lagrimal en animales afectados por QCS documentados en un estudio, revelaron que el 87% de los casos presentaban diversos grados de adenitis multifocal crónica e infiltración linfoplasmocitaria asociada a una atrofia acinar¹⁰⁴.

Estos hallazgos, unidos a la existencia concurrente de enfermedades con un componente inmunológico¹⁰⁵, y la respuesta de la enfermedad a terapias inmunomoduladoras, ^{20,67,73,106,119,154,158,176,212,231,247,249} consolidan la sospecha de la existencia de mecanismos inmunomediados como la causa más frecuente de QCS en un amplio porcentaje de los casos clínicos.

En múltiples estudios en los que se han empleado tanto modelos humanos como animales afectados de síndrome de Sjögren (una enfermedad de características muy similares a la QCS canina), se han encontrado diversos tipos de autoanticuerpos dirigidos contra las glándulas lagrimales, lo que vendría a confirmar las sospechas sobre el origen inmunomediado de la enfermedad.^{90,130,197,253,262}

El modelo clásico de disfunción o hipofunción de las glándulas lagrimales considera que la pérdida de secreción se debe a la destrucción inmunitaria del tejido glandular y a la apoptosis del epitelio glandular que se produce a continuación.²⁶⁷

Durante el curso del síndrome de ojo seco se produce una infiltración linfocítica progresiva y masiva principalmente de las células T CD4 + en la glándula lagrimal y en la conjuntiva. Dentro de los tejidos oculares, estos linfocitos son capaces de liberar citoquinas/quimioquinas proinflamatorias en la lágrima y en la superficie ocular.²³⁰

Las células del epitelio corneal y conjuntival pueden ser estimuladas para expresar moléculas inflamatorias como las citoquinas y moléculas de adhesión celular, lo cual puede promover la activación y el reclutamiento de más linfocitos hacia los tejidos oculares y la glándula lagrimal exacerbando la inflamación de la superficie ocular y provocando alteraciones de la cantidad y composición de la película lagrimal.^{99,189}

La producción de citoquinas proinflamatorias, se ha asociado a procesos patológicos tales como la queratinización epitelial,¹¹¹ hipostesia relativa de la superficie ocular,²¹⁸ alteraciones de la expresión de las mucinas de la película lagrimal⁸⁸ y neovascularización corneal.³⁸

Las citoquinas no sólo perpetúan el ataque inmunológico a la glándula lagrimal estimulando el reclutamiento y la proliferación de linfocitos sino que también interfieren con el normal funcionamiento glandular.²⁶⁷

La producción de citoquinas inflamatorias IL-1 β y TNF α se ha relacionado con la inhibición de la liberación de los neurotransmisores implicados en la producción lagrimal.^{265,266}

Es bastante probable que la resistencia a la apoptosis de los linfocitos que infiltran el tejido glandular, más que la apoptosis de las células epiteliales "per se", pueda jugar un papel importante en la fisiología de tejido lagrimal.²⁶⁷

En un estudio realizado con perros con QCS espontánea, Gao describió una menor apoptosis linfocitaria y una mayor apoptosis en las células epiteliales lagrimales comparado con perros normales. Los linfocitos no apoptóticos eran activamente citotóxicos, invadían los tejidos glandulares, produciendo citoquinas inflamatorias que dañaban los tejidos y transportaban factores apoptóticos (como el antígeno Fas), que se unían a receptores celulares del epitelio glandular induciendo su muerte.⁶⁷

La inflamación de la superficie ocular se puede iniciar por desecación, hiperosmolaridad lagrimal, microtraumatismos producidos por los propios párpados durante el parpadeo, liberación de sustancias proinflamatorias desde la glándula lagrimal o los párpados, y debido a un menor aporte de factores tróficos desde las lágrimas o los nervios corneales.⁹⁶

La inflamación crónica provoca la activación de los genes responsables de la expresión de queratinas, lo que da lugar a una hiperqueratinización del epitelio corneal y conjuntival, que transforma la superficie ocular en una superficie seca y pobremente lubricada.^{163,241}

Asociado a la inflamación crónica también se produce una disminución de la sensibilidad corneal y por consiguiente una menor producción lagrimal refleja que se acompaña de una menor liberación de sustancias neurotróficas por parte de los nervios que inervan la córnea, contribuyendo a agravar la enfermedad ocular.^{159,218}

El proceso inflamatorio está generalmente limitado a las capas más externas de la superficie ocular. El paso a capas más profundas de citoquinas y linfocitos está impedido por un epitelio y una membrana basal intacta.²⁵⁹ Sin embargo, si estas capas están dañadas por causas traumáticas, iatrogénicas o como resultado de una inflamación severa, la interacción de las citoquinas proinflamatorias con los queratinocitos estromales puede dar lugar a una cicatrización subepitelial extensa o a una fusión del estroma que pondrá en serio peligro la visión del ojo afectado.²⁵⁹

Independientemente de los factores que den lugar a la QCS, hay una vía común final para la expresión de la enfermedad que afecta a la película lagrimal. Las características comunes incluyen una película lagrimal inestable, hiperosmolaridad lagrimal y daño de la superficie ocular asociado a molestias oculares y disminución de la visión.¹²⁸

Los signos clínicos presentes en la QCS dependen de la severidad y de la duración del déficit lagrimal.¹⁷⁵

Existen dos formas clínicas de presentación de la QCS canina:

- En las **formas de presentación agudas**, el incremento brusco de la osmolaridad de la lágrima produce deshidratación de la superficie corneal y conjuntival, dando lugar a edema, degeneración vacuolar y a un adelgazamiento generalizado de la córnea y de la conjuntiva.⁷⁰

El paciente presenta un fuerte dolor ocular, asociado a ulceración o erosión corneal que se manifiesta con blefarospasmo, enoftalmia, entropión y fotofobia.³¹ En estos casos la inflamación supurativa puede dar lugar a una enfermedad corneal progresiva con queratomalacia estromal, descemetocel, estafiloma y prolapso de iris.⁷⁷

- En la **forma de presentación crónica**, la más frecuente, los signos clínicos van progresando a lo largo de semanas o meses.⁷⁷

El signo clínico característico es una secreción ocular mucoide o mucopurulenta que se adhiere a la superficie corneal y conjuntival.³¹

El acúmulo de secreciones en los párpados está asociado con frecuencia a dermatitis periorbitales, blefaritis y alergias oculares que coexisten en una relación mutua de causa efecto con la sequedad ocular.^{12, 77, 170}

A medida que la enfermedad se cronifica se produce un engrosamiento y una queratinización del epitelio corneal y conjuntival, el estroma corneal anterior se infiltra con células inflamatorias y vasos sanguíneos y se producen precipitados subepiteliales distróficos de melanina mayoritariamente, y en menor medida de lípidos o calcio, que comprometen seriamente la visión.^{107,108}

Se produce un incremento de la descamación de las células del epitelio corneal debido al aumento de la fricción producida durante el parpadeo, entre una superficie corneal escasamente lubricada y un epitelio conjuntival palpebral engrosado y queratinizado.¹⁰⁸

La superficie conjuntival responde a la sequedad ocular con enrojecimiento, quemosis e hipertrofia secundaria a la metaplasia escamosa y queratinización del epitelio conjuntival.¹⁰⁸ Si no se controla, la estimulación ambiental constante y el aumento de las fuerzas superficiales de rozamiento pueden causar más irritación, descamación anormal del epitelio corneal e hiperemia de los vasos conjuntivales.²²⁹

Paradójicamente se ha observado que los cambios inflamatorios característicos de las formas más severas de QCS pueden dar lugar a un descenso de la sensibilidad corneal, explicando así la escasez de síntomas en estos pacientes.²²⁹

Los principales cambios celulares del epitelio corneal asociados a la QCS^{160,161,204} son:

1. Aumento en el tamaño de las células epiteliales.
2. Presencia de alteraciones nucleares.
3. Aumento del ratio N:C.
4. Incremento de los espacios intercelulares.
5. Queratinización epitelial.
6. Cambios en la tinción citoplasmática que pasa de eosinófila a basófila.

En la forma aguda de la QCS se produce una degeneración corneal con vacuolización y adelgazamiento del epitelio. La córnea no se infiltra inicialmente con células inflamatorias o vasos sanguíneos, pero con la pérdida progresiva del epitelio se produce una queratitis supurativa y puede haber pérdida del estroma, lo que puede inducir una respuesta fibrovascular.⁷⁷

En la forma crónica, el epitelio se vuelve hiperplásico y queratinizado, y existen gránulos de melanina dispuestos en el epitelio y en el estroma anterior. Con el paso del tiempo la membrana basal se ondula formando pliegues en el epitelio y el estroma anterior, que se vasculariza e infiltra de forma difusa por células plasmáticas y linfocitos.⁷⁷

El **objetivo del tratamiento** de la QCS es intentar recrear el ambiente ocular óptimo.³¹

La terapia médica se establece en función de las características particulares de cada individuo, y la respuesta al tratamiento se va a ver influenciada entre otros factores por las enfermedades subyacentes, la severidad del cuadro clínico y la capacidad del dueño para cumplir con el tratamiento prescrito.⁷⁷

El tratamiento médico generalmente consiste en alguna combinación de lágrimas artificiales, antiinflamatorios tópicos, antibióticos tópicos, agentes mucinolíticos y fármacos estimulantes de la producción lagrimal.⁷⁷

Entre los fármacos estimulantes de la producción lagrimal utilizados en oftalmología veterinaria, destacan tres potentes agentes inmunomoduladores como son la ciclosporina A^{67,104,105}, el tacrolimus¹⁵ y el pimecrolimus.^{165,175}

El mecanismo central de acción de estos fármacos, también conocidos como inhibidores de la Calcineurina, es evitar la producción de citoquinas inflamatorias por parte de los linfocitos al interferir con los mecanismos involucrados en la activación de las células T.²³⁵

3.3.1. Diagnóstico de la QCS

La QCS es un trastorno frecuente que afecta a la población canina general y dado que los signos clínicos son inespecíficos en las primeras fases de la enfermedad, muchas veces se diagnostica erróneamente como una conjuntivitis primaria irritativa o bacteriana.^{77,214}

El diagnóstico del ojo seco está basado en los signos clínicos y, fundamentalmente en la especie canina, en la prueba lagrimal de Schirmer (PLS).⁸¹

La **prueba lagrimal de Schirmer (PLS)** es un método semicuantitativo que permite determinar el componente acuoso de la película lagrimal y es, en la actualidad, la técnica más empleada en la clínica oftalmológica veterinaria para diagnosticar la QCS.¹⁰⁰

Existen dos modos de realizar la PLS que varían en función del tiempo empleado en realizar la técnica y el empleo o no de anestesia tópica.

La **prueba lagrimal de Schirmer I (PLS I)** es la más comúnmente empleada. Se realiza colocando una tira de papel de filtro de 5x35 mm, en el fondo de saco del tercio medial del párpado inferior durante 1 minuto sin emplear anestesia tópica. Mide tanto la producción basal lagrimal como la producción refleja provocada por la irritación generada por el papel del filtro. Los valores de la PLS I normales en perros oscilan entre 18.64 ± 4.47 mm/min y 23.90 ± 5.12 mm/min según los distintos autores.^{69,83,109,261}

En la QCS canina, valores de la PLS I por debajo de 15 milímetros/minuto se consideran significativos cuando están asociados a signos como ulceración corneal, depósitos de pigmento en la superficie corneal, y/o a conjuntivitis mucopurulenta.¹⁰⁷

En la **prueba lagrimal de Schirmer II (PLS II)** se utilizan las mismas tiras de papel de filtro que en la PLS I. La tira se mantiene en el saco conjuntival durante 5 minutos, previa aplicación de anestesia tópica, lo cual elimina la producción lagrimal refleja y permite medir solo la producción basal. Los valores de la PLS II son más variables y se han reportado rangos entre 3.6 ± 2.8 mm/min y 13.95 ± 4.40 .^{69, 83, 86,261}

Aunque la PLS es fácil de realizar y su uso clínico generalizado se ha mantenido durante más de un siglo, tiene muchas desventajas. Diversos autores han criticado su escasa reproducibilidad y sensibilidad para detectar pacientes con sequedad ocular, ya que obtener valores normales no excluye que el paciente padezca un síndrome de ojo seco, simplemente indica que existe una buena producción de lágrima, y que sería apropiado emplear otras pruebas diagnósticas diferentes.^{34,102,128,157,177}

Su sensibilidad es mayor cuando la QCS está en un estadio avanzado, ya que hay una menor producción lagrimal y los resultados son más reproducibles.

En los estadios iniciales de la enfermedad, que se acompaña de signos leves o moderados, la PLS tiene una utilidad limitada.¹²⁸

Hay múltiples variables que afectan a la reproducibilidad de la PLS:

- La posición del papel de filtro en el ojo y la variable respuesta de lagrimeo provocada por el papel según la sensibilidad corneal.^{80,246}
- La influencia de la evaporación, la temperatura y la humedad ambiental.^{80,246}
- La aplicación reciente de medicaciones que aumentan o disminuyen la producción lagrimal.¹⁰⁹
- Según el momento del día en que se realice la prueba, el sexo, la edad, el peso del perro y si está esterilizado o no, los resultados pueden variar.^{8,9,16,86,224}
- La estimulación simpática inducida por el miedo que experimentan algunos animales en la consulta disminuye falsamente los valores reales de lágrima.¹⁰⁹
- La realización de la prueba en perros con los ojos cerrados o abiertos puede arrojar resultados diferentes.^{106,210}
- La manipulación de la punta del papel de filtro con los dedos puede alterar los resultados de la prueba. Esto es debido a que el depósito de lípidos cutáneos provenientes de las manos del oftalmólogo en el papel puede interferir con la absorción de la lágrima del paciente.⁷

La **prueba de rojo fenol** es un método de medida del componente acuoso de la lágrima que consiste en situar un hilo de algodón impregnado de rojo fenol, un indicador de pH, en el fórnix conjuntival inferior durante 15 segundos. La producción lagrimal se mide en milímetros según la longitud de hilo que ha cambiado de color de amarillo a naranja.⁸²

El rango de normalidad oscila de 30 a 38 mm según Brown²⁶ y de 23.9 ± 3.45 mm según Saito y Kotani.²¹¹

La tira de rojo fenol estimula menos la producción de lágrimas y es más adecuada que la PLS para los mamíferos pequeños, sin embargo aún no ha encontrado un lugar en la evaluación habitual de la película lagrimal canina. La ventaja de esta prueba es que es muy rápida y poco invasiva, pero por el contrario es difícil de interpretar si el cambio de color es sutil o no existe cambio, y además no está disponible de manera habitual.²⁶

El empleo de la **fluoresceína sódica** en oftalmología es particularmente útil en la valoración de la integridad de la superficie ocular.^{7,178,209}

La fijación de la fluoresceína a la superficie ocular ha sido explicada por su acumulación en los espacios intercelulares debido a la alteración de las uniones de las células epiteliales y/o al daño de células epiteliales corneales y conjuntivales.^{63,258}

Sin embargo, la valoración de la tinción corneal con fluoresceína se ha basado en una lectura cualitativa de los resultados, lo que ha limitado los análisis estadísticos y las comparativas.

El método de tinción de la superficie ocular necesita ser estandarizado dada la gran cantidad de variables que pueden influir en la lectura del mismo, como son la concentración del colorante, el volumen aplicado, la técnica de instilación, el intervalo entre la instilación y la observación, el empleo de filtros en la observación y la utilización de sistemas de gradación estandarizados.⁷

La tinción **rosa de bengala**, ($C_{20}H_2Cl_4Na_2O_5$), es en esencia fluoresceína a la que se han añadido sustancias halógenas para producir moléculas de diferente color.

Esta tinción permite identificar áreas de la superficie ocular cuyo epitelio está dañado, bien debido a que la capa mucínica es deficiente o está ausente, porque las células epiteliales están dañados o muertas, o bien porque los tejidos subyacentes están expuestos externamente. Tales condiciones pueden ocurrir en pacientes con sequedad ocular, heridas mecánicas, quemaduras o infecciones de la superficie ocular.¹⁶²

El rosa de bengala presenta los mismos inconvenientes que la fluoresceína, a los que hay que sumar los que derivan de su toxicidad. Dentro de la célula, el rosa bengala induce una pérdida de vitalidad que se manifiesta en cambios morfológicos celulares, pérdida de motilidad, e incluso muerte celular. Estos efectos se incrementan por exposición a la luz. El uso repetido del rosa de bengala está contraindicado en casos de las úlceras corneales y conjuntivales, ya que puede teñir los tejidos conectivos subyacentes durante mucho tiempo o permanentemente.^{63,114,162}

El **tiempo de ruptura lagrimal (TRL)** es en la actualidad el método más empleado para valorar la estabilidad de la película lagrimal.²¹⁶

Se define como el intervalo entre el último parpadeo completo y la aparición del primer punto de ruptura de la película lagrimal en la superficie corneal.^{125,173,174}

La prueba consiste en instilar una gota de fluoresceína sódica en el fondo del saco palpebral inferior, y tras varios parpadeos, se mantiene el ojo abierto y se examina la película lagrimal con la lámpara de hendidura empleando el filtro azul cobalto.¹⁵⁷

El tiempo de ruptura lagrimal se mide en segundos, y se estima que tiempos de ruptura lagrimal menores de 20 segundos son anormales en perros e indican inestabilidad de la película lagrimal precorneal.¹⁵⁵

La inestabilidad de la lágrima es uno de los hallazgos más comunes en pacientes con signos de irritación ocular y ha sido asociada a déficit lagrimal, disminución de la calidad y cantidad de la capa lipídica, alteración de la composición de la lágrima, irregularidades de la superficie corneal y a inflamación de la superficie corneal.^{37,124,125,139}

El tiempo de ruptura lagrimal ha sido considerado por muchos como la prueba diagnóstica principal en prácticamente todos los tipos de ojo seco debido a su alta reproducibilidad y baja variabilidad.^{146,181,248,264}

Sin embargo, otros autores han criticado esta prueba por ser poco sensible y no estar perfectamente estandarizada, y ser de difícil realización en el perro. Estos autores ponen de manifiesto diversas variables críticas que pueden afectar a la perfecta interpretación de los resultados como son el volumen de fluoresceína instilada, el tiempo transcurrido desde la instilación del colorante hasta el inicio de la prueba, la concentración de la fluoresceína y los diferentes tipos de filtros empleados.^{7,97,207,216,251}

La ***citología de impresión corneal*** ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de diversos modelos de ojo seco que se acompañan con metaplasia escamosa progresiva de la superficie ocular y disminución de células caliciformes conjuntivales a medida que la enfermedad se agrava.^{6,160,161,168,204,208,243}

La metaplasia escamosa es un fenómeno muy típico en diversas patologías que cursan con sequedad de la superficie ocular como la conjuntivitis cicatrizante, la conjuntivitis no cicatrizante crónica (queratoconjuntivitis límbica superior), la deficiencia de vitamina A, la displasia / neoplasia de la superficie ocular y por supuesto la QCS.³⁰

La correlación existente entre el grado de metaplasia escamosa de las células epiteliales de la superficie ocular con el grado de severidad de la enfermedad permite realizar un diagnóstico precoz y un seguimiento objetivo de la enfermedad independientemente de la sintomatología que presente el paciente.^{160,161}

Además de la observación directa y caracterización de las alteraciones celulares metaplásicas por microscopía óptica, las nuevas técnicas de laboratorio como la inmunofluorescencia, la inmunoperoxidasa, la RT-PCR y la citometría de flujo entre otras han permitido la aplicación de la citología de impresión al entendimiento del síndrome de ojo seco como un proceso inflamatorio de naturaleza inmunomediada.^{10,11,22,25,29,99,187,188,190,226}

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales incluidos en el estudio

En el presente estudio se han incluido 60 perros de diferentes razas, 21 machos y 39 hembras, con edades comprendidas entre los 3 meses y los 13 años con una media de edad de $6,4 \pm 3.21$ años. Los animales han sido seleccionados entre los pacientes del servicio de oftalmología del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid y del Centro Veterinario La Caseta de Madrid. También se han seleccionado individuos reproductores de los criaderos caninos Lupiak y Gallumar situados en la provincia de Guadalajara.

Los animales incluidos en el estudio han sido divididos en dos poblaciones: el grupo I, formado por pacientes sanos, y el grupo II, formado por pacientes diagnosticados de QCS.

El grupo I está formado por 31 perros, 13 machos y 18 hembras, de diferentes razas con edades comprendidas entre los 3 meses y los 9 años y un promedio de edad de 4.9 ± 2.89 años. Los criterios de inclusión en este grupo son tener unos valores en la PLS I iguales o superiores a 15 mm/min, y no haber presentado ninguna enfermedad ocular previa, ni ninguna anomalía congénita ocular que pudiera influir en la interpretación de la citología corneal. (Tabla 1)

| RAZA | HEMBRAS | MACHOS |
|-----------------------------|-----------|-----------|
| YORKSHIRE TERRIER | 2 | 1 |
| BICHON MALTES | 1 | 0 |
| BEAGLE | 5 | 1 |
| SHIH TZU | 3 | 0 |
| BULLDOG FRANCES | 0 | 1 |
| SCHNAUZER MINIATURA | 1 | 1 |
| GOLDEN RETRIEVER | 2 | 1 |
| WEST HIGHLAND WHITE TERRIER | 0 | 3 |
| POMERANIA | 1 | 0 |
| CHIHUAHUA | 1 | 0 |
| COCKER SP. INGLES | 1 | 1 |
| BICHON HABANERO | 0 | 1 |
| BICHON FRISE | 0 | 1 |
| LHASA APSO | 0 | 1 |
| MESTIZO | 1 | 0 |
| TECKEL | 0 | 1 |
| TOTAL | 18 | 13 |

Tabla 1. Animales incluidos en el grupo I.

El grupo II está formado por 29 perros, 8 machos y 21 hembras, de diferentes razas con edades comprendidas entre 1 año y 13 años con un promedio de edad de $7,7 \pm 2.93$ años. Los animales incluidos en este grupo han presentado unos valores en la PLS I comprendidos entre 0 y 14 mm/min, y signos clínicos compatibles con QCS (hiperemia conjuntival, exudado ocular mucoso o mucopurulento, queratitis y/o signos de molestias oculares como blefarospasmo o fotofobia). (**Tabla 2**)

| RAZA | HEMBRAS | MACHOS |
|--------------------|-----------|----------|
| YORKSHIRE TERRIER | 2 | 4 |
| BEAGLE | 2 | 1 |
| SHIH TZU | 1 | 0 |
| BULLDOG FRANCES | 0 | 1 |
| SCHNAUZER | 2 | 0 |
| GOLDEN RETRIEVER | 1 | 0 |
| WEST HIGHLAND W.T. | 1 | 0 |
| COCKER SP. INGLES | 5 | 2 |
| BULLDOG INGLES | 5 | 0 |
| MESTIZO | 1 | 0 |
| BULL TERRIER | 1 | 0 |
| TOTAL | 21 | 8 |

Tabla 2. Animales incluidos en el grupo II.

Los ojos de los animales del grupo II han sido categorizados en 3 subgrupos en función de los resultados obtenidos en la prueba la PLS I: (**Gráfico 1**)

- Un grupo formado por 25 ojos con valores en la PLS I ≤ 5 mm/min categorizados dentro de una QCS grave.
- Un grupo formado por 10 ojos con valores en la PLS I entre 6 y 10 mm/min categorizados dentro de una QCS moderada.
- Un grupo formado por 8 ojos con valores en la PLS I entre 11 y 14 mm/min categorizados dentro de una QCS subclínica.

4.2. Protocolo de exploración oftalmológica

Todos los animales incluidos en ambos grupos han sido sometidos a una exploración oftalmológica completa, tras la cual se han obtenido las muestras de la superficie central de la córnea para su posterior estudio citológico.

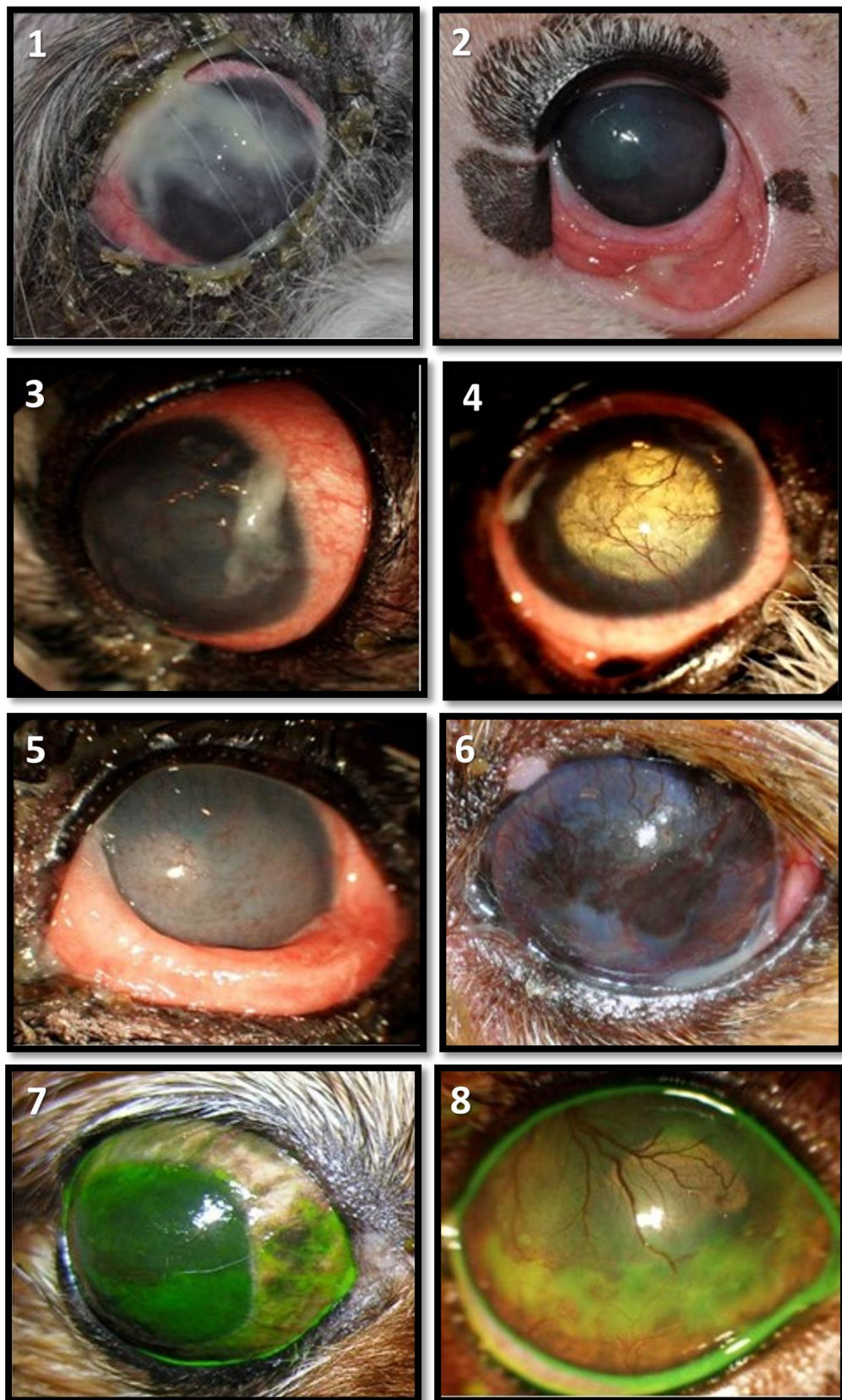
El protocolo de exploración oftalmológica fue el siguiente:

- Realización de la PLS I con tiras con colorante azul (Schering-Plough Animal Health, Kenilworth, NJ, USA), con el fin de valorar el componente acuoso de la película lagrimal.
- Exploración de los anejos oculares y del segmento anterior utilizando lámparas de hendidura portátiles, Kowa SL15 (Kowa, Tokio, Japón) y Shin-Nippon XL-1 (Ajinomoto Trading, Inc., Japon).
- Aplicación de una gota de Fluoresceína sódica al 2% (Colircusi Fluoresceína®, Alcon Cusi S.A), limpieza con suero fisiológico estéril de ambos ojos y exploración biomicroscópica de la superficie ocular empleando un filtro azul cobalto.
- Medición de la presión intraocular mediante un tonómetro de rebote (TonoVet®, Icare, Finlandia).

4.3. Criterios de valoración de la superficie ocular

Los criterios de clasificación elegidos para valorar las alteraciones oculares de los animales incluidos en este estudio están detallados a continuación.

- Secreción conjuntival. **(Figura 1)**
- Hiperemia de la conjuntiva palpebral. **(Figura 2)**
- Hiperemia de la conjuntiva bulbar. **(Figura 3)**
- Neovascularización corneal. **(Figura 4)**
- Infiltrado inflamatorio corneal. **(Figura 5)**
- Pigmentación de la superficie corneal. **(Figura 6)**
- Valoración de la integridad del epitelio conjuntival después de instilar fluoresceína sódica al 2%. **(Figura 7)**
- Valoración de la integridad del epitelio corneal después de instilar fluoresceína sódica al 2%. **(Figura 8)**



Figuras 1-8. Signos clínicos utilizados como criterios de clasificación para valorar la superficie ocular.

4.4. Citología de impresión corneal

4.4.1. Recogida de muestras

Todas las muestras se han tomado de la misma forma y han sido procesadas por la misma persona para evitar variaciones en el tratamiento de las mismas.

El procedimiento utilizado se describe de forma secuencial:

➤ Aplicación de una gota de Hidrocloruro de Oxibuprocaina e Hidrocloruro de Tetracaína (Colircusí Anestésico Doble®, Alcón Cusí S.A) en cada ojo 2 veces con un intervalo de 5 minutos.

➤ Preparación del papel de filtro

La membrana de filtración empleada (Millipore HAWP304F0 MA) está compuesta por acetato de celulosa y tiene un tamaño de poro de 0.45 µm.

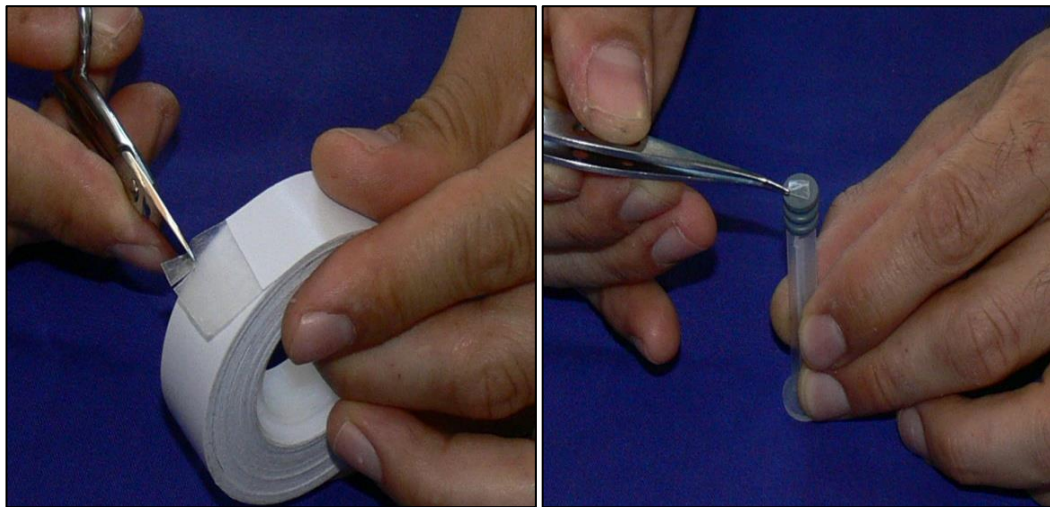
Las membranas han permanecido sumergidas en agua destilada desde el día anterior al estudio y se han secado antes de tomar la muestra, momento en el que han sido recortadas en pequeños fragmentos de 1 cm².

➤ Preparación del dispositivo de toma de muestras

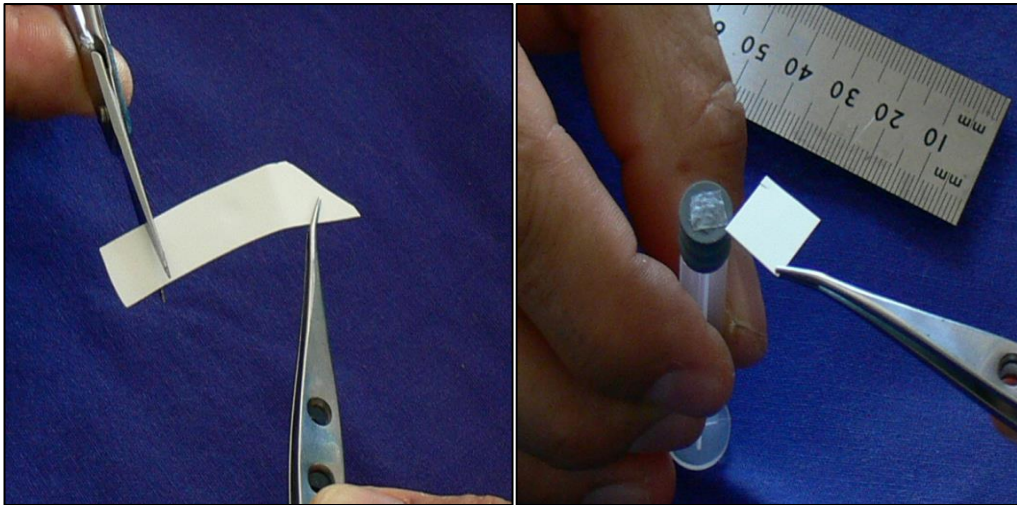
Con el objetivo de facilitar el sistema de recogida y manejo de las muestras, adecuar la técnica para su empleo en animales que poseen un tercer párpado y disminuir al mínimo cualquier tipo de lesión iatrogénica sobre la superficie ocular se ha utilizado un dispositivo integrado por un émbolo de plástico de 5.5 cm de longitud y un cilindro plano de goma en el extremo anterior de 0.8 cm de longitud y 0.9 cm de diámetro. **(Figura 9)** A dicho cilindro se ha adherido un pequeño fragmento de cinta adhesiva de doble cara **(Figuras 10 y 11)** sobre el que se ha dispuesto la membrana de acetato de celulosa. **(Figuras 12, 13 y 14)**



Figura 9. Émbolo de plástico con punta de goma utilizado en la toma de muestras.



Figuras 10 y 11. Recorte y aplicación de un fragmento de papel adhesivo de doble cara sobre la superficie anterior del émbolo.



Figuras 12 y 13. Recorte y pegado de la membrana de acetato de celulosa sobre la superficie del émbolo.



Figuras 14. Dispositivo montado y preparado para la toma de muestras.

➤ Aplicación de la membrana de celulosa sobre el ojo del animal

Los ojos se han secado cuidadosamente con una gasa para eliminar el exceso de humedad y secreciones de la superficie corneal. Un ayudante ha sujetado la cabeza del animal mientras la persona encargada de tomar la muestra ha mantenido abiertos los párpados del paciente con una mano y con la otra ha aplicado el dispositivo durante 10 segundos sobre el área central de la córnea. **(Figura 15)**

Se ha ejercido una presión firme pero delicada sobre la superficie ocular y una vez transcurridos los 10 segundos, se ha retirado suavemente el dispositivo provocando una descamación de las células superficiales de la córnea.

Se han tomado dos citologías de cada ojo para asegurar la obtención de una muestra significativa.

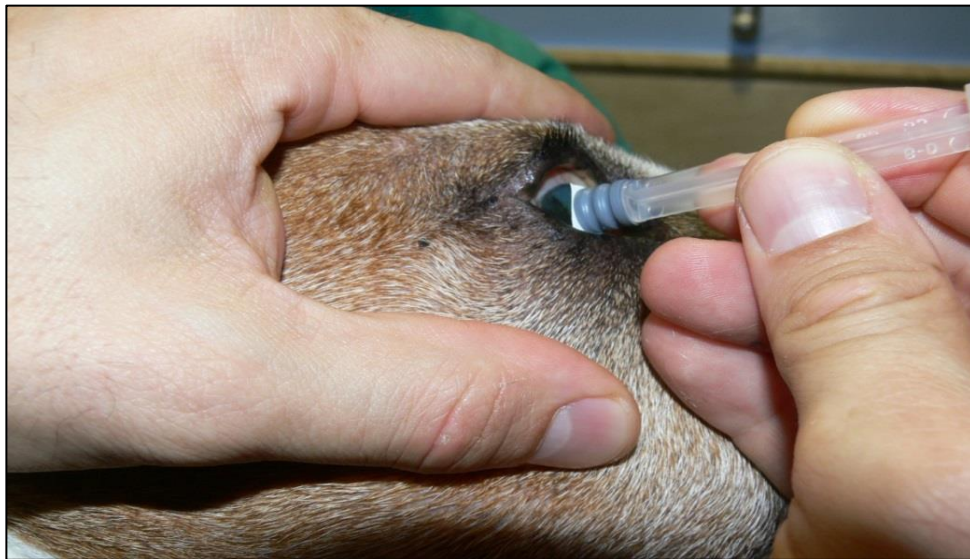


Figura 15. Aplicación de la membrana de acetato de celulosa sobre la superficie corneal.

4.4.2. **Procesado de las muestras**

➤ Identificación de las muestras

Se han utilizado portaobjetos de vidrio con uno de sus extremos esmerilado, donde se ha escrito el nombre y número de ficha del animal y la fecha de recogida de la muestra. **(Figura 16)**

Se han empleado clips recubiertos de plástico para sujetar las muestras al portaobjetos evitando así las manchas de óxido que generaban los sistemas de sujeción sin cobertura en las membranas de filtración como consecuencia de los procesos oxidativos derivados de la tinción.

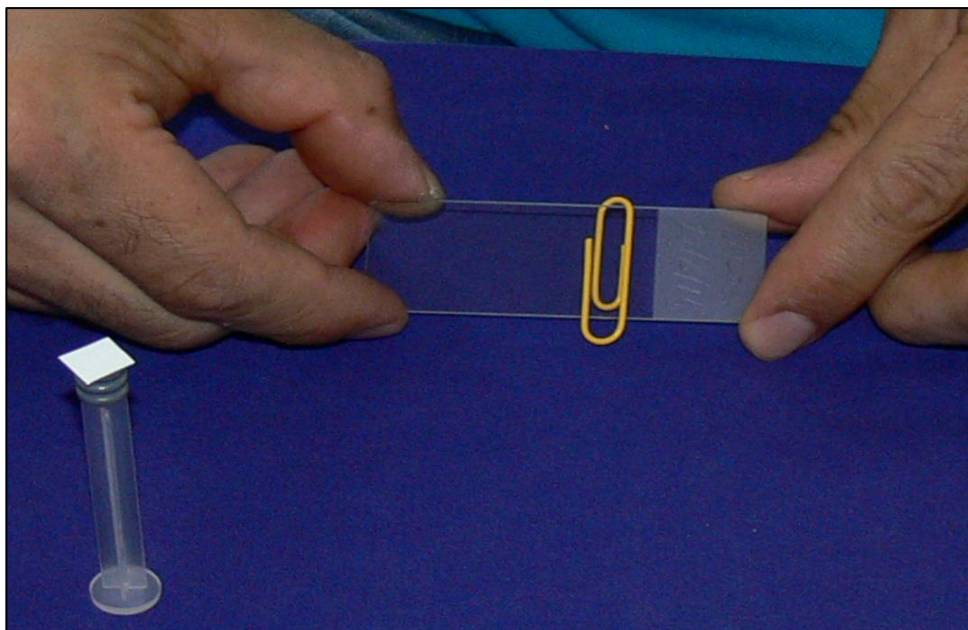


Figura 16. Portaobjetos con un extremo esmerilado para facilitar la identificación de las muestras.

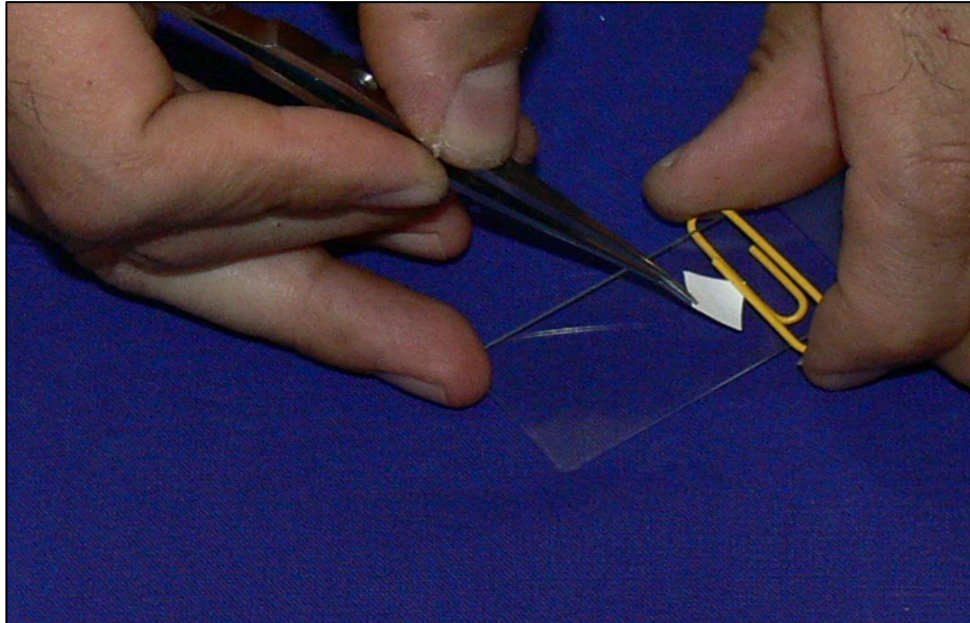


Figura 17. Procedimiento de sujeción de la muestra.

➤ Posicionamiento de las muestras:

Las muestras correspondientes al ojo derecho se han posicionado en el extremo más próximo a la zona esmerilada, y las del ojo izquierdo en el extremo más distal, con el fin de poder distinguir posteriormente a que ojo corresponde cada muestra. **(Figuras 17 y 18)**

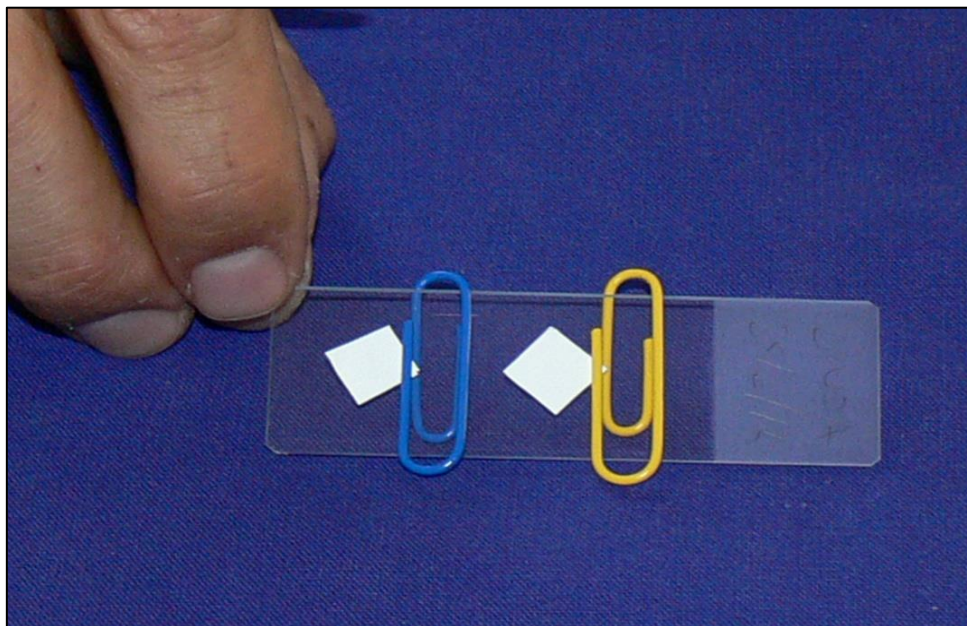


Figura 18. Muestras correspondientes al ojo derecho (clip amarillo) y al ojo izquierdo (clip azul).

➤ Fijación de las muestras

Las preparaciones se han sumergido en etanol de 96° durante al menos 10 minutos para su correcta fijación hasta su tinción.

➤ Tinción de las muestras

La técnica de tinción empleada es una modificación de la tinción PAS-Hematoxilina descrita por Rivas²⁰³ que ha constado de los siguientes pasos:

- Lavado con agua destilada durante 5 minutos.
- Inmersión en ácido periódico al 1% durante 10 minutos.
- Lavado con agua destilada durante 5 minutos.
- Aplicación de reactivo de Schiff por goteo durante 2 minutos.
- Lavado constante con agua del grifo durante 5 minutos.
- Inmersión en Hematoxilina de Harris previa filtración durante 2 minutos.
- Lavado constante con agua del grifo durante 5 minutos.
- Deshidratación con Etanol de 96° durante 2 minutos.
- Inmersión en Etanol de 100° durante 4 minutos.
- Inmersión en Xilol durante 6 minutos.

➤ Montaje de las muestras:

Una vez realizada la tinción y retirados los clips, se han empleado unas pinzas de Adson sin dientes para proceder al montaje de las muestras con resina de montaje DPX (Casa Álvarez, Madrid, España) y un cubreobjetos de 24x24 mm.

4.4.3. Estudio morfométrico de las muestras

Las imágenes utilizadas para realizar la valoración morfométrica de las muestras, han sido obtenidas con un microscopio óptico Olympus BX50, con cámara fotográfica Olympus DP50 (Olympus, Tokio, Japón) y posteriormente procesadas informáticamente mediante los programas Viewfinder Lite® y StudioLite® (Better Light Inc, San Carlos, CA, USA).

Las medidas morfométricas de las células corneales se han realizado manualmente empleando el programa de procesamiento digital ImageJ (JAVA, Sun Microsystems, Santa Clara, CA, USA).

La valoración morfométrica de las células se ha realizado atendiendo a los siguientes criterios:

- Celularidad de la muestra.
- Separación intercelular.
- Morfología de las células.
- Tinción citoplasmática.
- Tamaño celular.
- Tamaño nuclear.
- Relación núcleo/citoplasma.
- Alteraciones nucleares.

4.5. Estudio estadístico

Los datos obtenidos han sido analizados utilizando el programa SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) en el Área de apoyo al usuario de los servicios de informática de la Universidad Complutense de Madrid.

Para el análisis descriptivo de los datos relativos al tamaño celular se ha calculado la media, la desviación estándar, la mediana, los intervalos de confianza al 95% superior e inferior para la media y el valor máximo y mínimo de cada ojo por separado.

Los resultados relativos al tamaño citoplasmático, tamaño nuclear y ratio N:C fueron expresados en forma de media \pm desviación estándar (DE), considerándose estadísticamente significativos valores de $P < 0.05$.

Se ha realizado un estudio comparativo entre los ojos izquierdo y derecho de todos los perros del estudio empleando la prueba T de Student para valorar la existencia de diferencias significativas en las medidas citoplasmáticas, nucleares o en el ratio N:C.

La correlación entre los ojos derecho e izquierdo de todos los individuos se ha confirmado posteriormente utilizando la prueba de correlación de Pearson.

El estudio morfométrico comparativo entre el grupo I y el grupo II ha sido llevado a cabo empleando la prueba T de Student. Para ello se han utilizado las medias de ambos ojos, y en el caso de los individuos con un único ojo o en los que sólo uno de los ojos estaba afectado se ha tomado la media de los valores de ese ojo.

Para demostrar la correlación existente entre los valores obtenidos en la PLS I con las medidas citoplasmáticas, nucleares y el ratio N:C de todos los individuos se ha estudiado cada ojo por separado. Para este estudio se ha empleado la prueba de correlación de Spearman.

Para el estudio de los subgrupos en los que se ha dividido el grupo II en función de la gravedad de la QCS, se ha utilizado la prueba de Kruskal-Wallis y un test no paramétrico de comparaciones múltiples para determinar si existen diferencias significativas entre ellos al estudiar alteraciones de las células de la superficie corneal.

El estudio comparativo entre el grupo de animales con el grado de QCS más leve (valores en la PLS I entre 11-14 mm/min) y los animales del grupo I se ha realizado utilizando el test de suma de rangos de Wilcoxon.

RESULTADOS

5.1. Resultados obtenidos de la exploración oftalmológica

5.1.1. Resultados de la prueba lagrimal de Schirmer I (PLS I)

5.1.1.1. Grupo I

Todos los animales incluidos en este grupo han presentado en la PLS I valores iguales o superiores a 15 mm/min. Se han realizado mediciones en 61 ojos, 31 ojos derechos y 30 ojos izquierdos. La media de los valores registrados en la PLS I ha sido de 23.18 ± 3.59 mm/min.

5.1.1.2. Grupo II

Todos los animales incluidos en este grupo han registrado valores en la PLS I inferiores a 15 mm/min en alguno de sus ojos. Se ha realizado la PLS I en 43 ojos en total, 20 ojos derechos y 23 ojos izquierdos. La media de la PLS I de los ojos incluidos en el estudio ha sido de 5.86 ± 4.76 mm/min.

En función de los resultados obtenidos en la PLS I los animales del grupo II han sido incluidos en 3 categorías diferentes:

- Un grupo formado por 25 ojos con valores en la PLS I ≤ 5 mm/min categorizados dentro de una QCS grave.
- Un grupo formado por 10 ojos con valores en la PLS I entre 6 y 10 mm/min categorizados dentro de una QCS moderada.
- Un grupo formado por 8 ojos con valores en la PLS I entre 11 y 14 mm/min categorizados dentro de una QCS leve o subclínica.

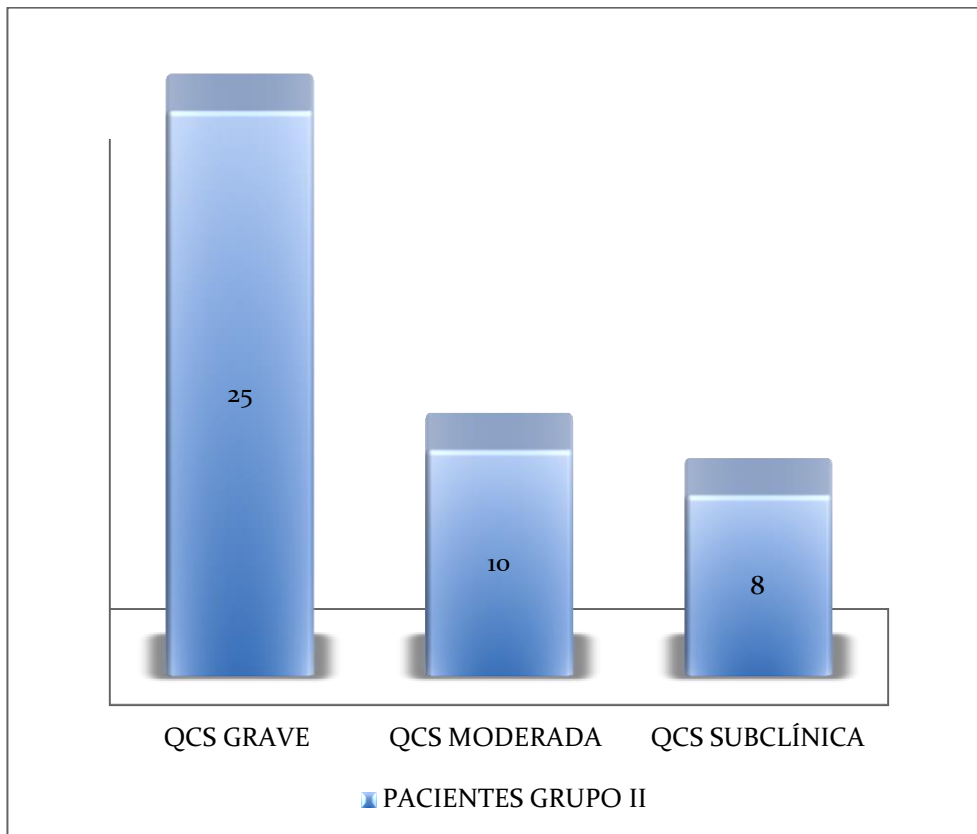


Gráfico 1. Clasificación de los animales del grupo II según el grado de gravedad de la QCS establecida a partir de los resultados obtenidos en la PLS I.

5.1.2. Análisis de los signos clínicos

Durante la realización del estudio biomicroscópico de la superficie ocular se han valorado los siguientes signos clínicos:

- Secreción conjuntival.
- Hiperemia de la conjuntiva palpebral.
- Hiperemia de la conjuntiva bulbar.
- Neovascularización corneal.
- Infiltrado inflamatorio corneal.
- Pigmentación de la superficie corneal.
- Fluorescencia de la superficie conjuntival.
- Fluorescencia de la superficie corneal.

5.1.2.1. Grupo I

El 100% de los individuos incluidos en este grupo presentaron un Grado 0 para todos los signos clínicos estudiados.

5.1.2.2. Grupo II

Todos los animales incluidos en este grupo han presentado signos clínicos compatibles con el Síndrome de ojo seco. Los signos clínicos se han categorizado en diferentes grados en función de la gravedad de los mismos. (**Gráfico 2**)

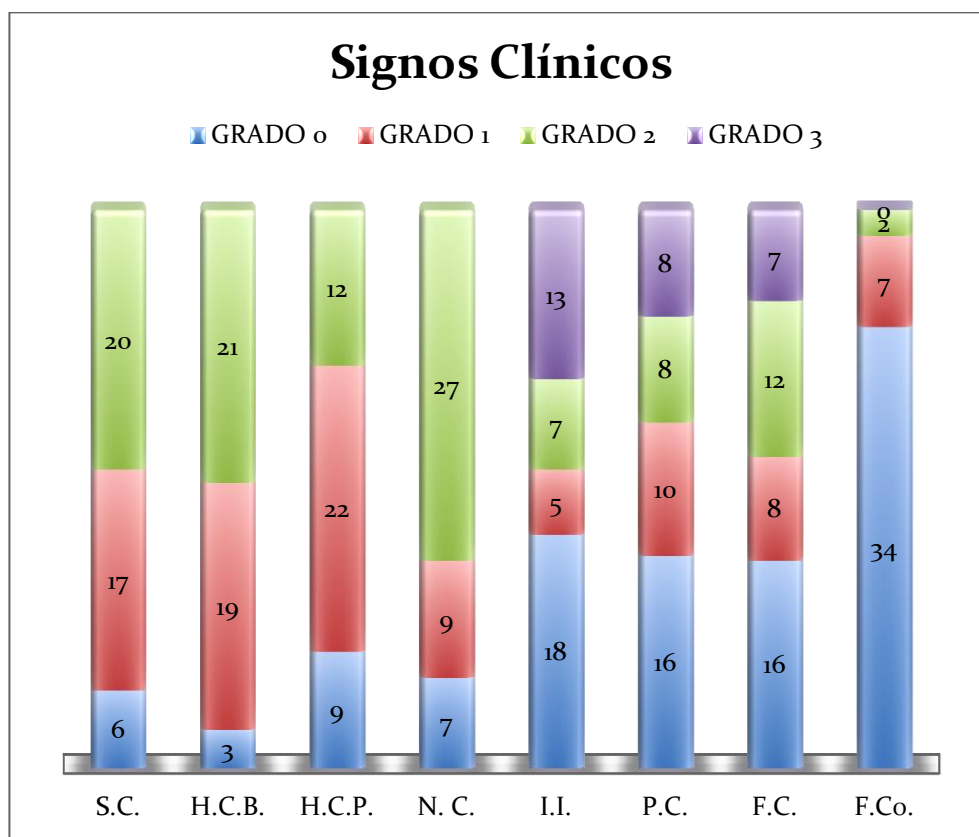


Gráfico 2. Gradación de los signos clínicos de los animales del grupo II.
 S.C. (Secreción conjuntival), H.C.B (Hiperemia Conjuntiva Bulbar), H.C.P. (Hiperemia de la Conjuntiva Palpebral), I.I. (Infiltrado Inflamatorio), P.C.(Pigmentación Corneal), F.C.(Fluorescencia Corneal), F.Co.(Fluorescencia Conjuntival)

El porcentaje de individuos del grupo II afectados por los distintos signos clínicos, independientemente de la gravedad del cuadro, han sido representados en el **Gráfico 3**.

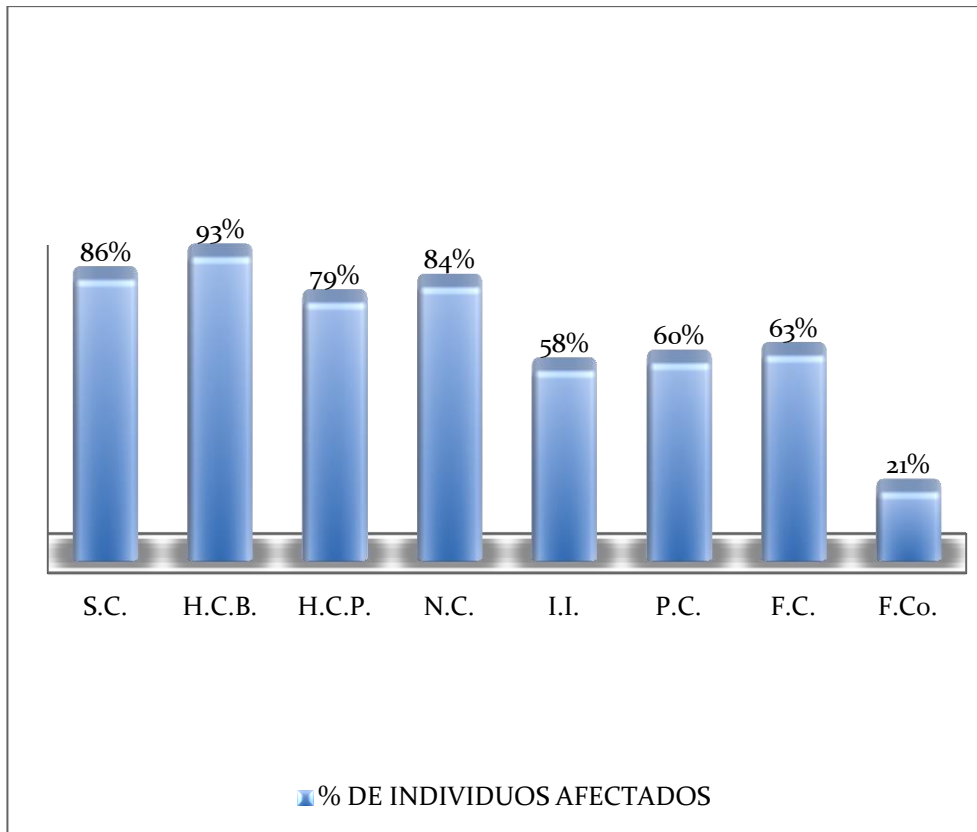


Gráfico 3. Porcentaje de animales del grupo II con signos clínicos compatibles con QCS. S.C. (Secreción conjuntival), H.C.B (Hiperemia Conjuntiva Bulbar), H.C.P. (Hiperemia de la Conjuntiva Palpebral), I.I. (Infiltrado Inflamatorio), P.C. (Pigmentación Corneal), F.C. (Fluorescencia Corneal), F.Co. (Fluorescencia Conjuntival)

5.2. Resultados del estudio citológico

5.2.1. Resultados del estudio morfométrico celular

5.2.1.1. Grupo I

Las citologías corneales del grupo I se han caracterizado por la presencia de láminas de células epiteliales, grandes y muy homogéneas con escasos espacios intercelulares e integradas por un número que variaba entre 20 y 40 células por campo. Estas presentaron una morfología poligonal, muy característica, con abundante citoplasma ligeramente basófilo y un núcleo pequeño, redondo y de localización central, con la cromatina finamente granular uniformemente distribuida. (**Figura 19**)

El estudio de las medidas celulares ha mostrado un área celular media de $1727.6 \mu\text{m}^2$ (DE 232.5), un área nuclear media de $131.3 \mu\text{m}^2$ (DE 14.1) y un ratio N:C de 1:13.3 (DE 1.5)

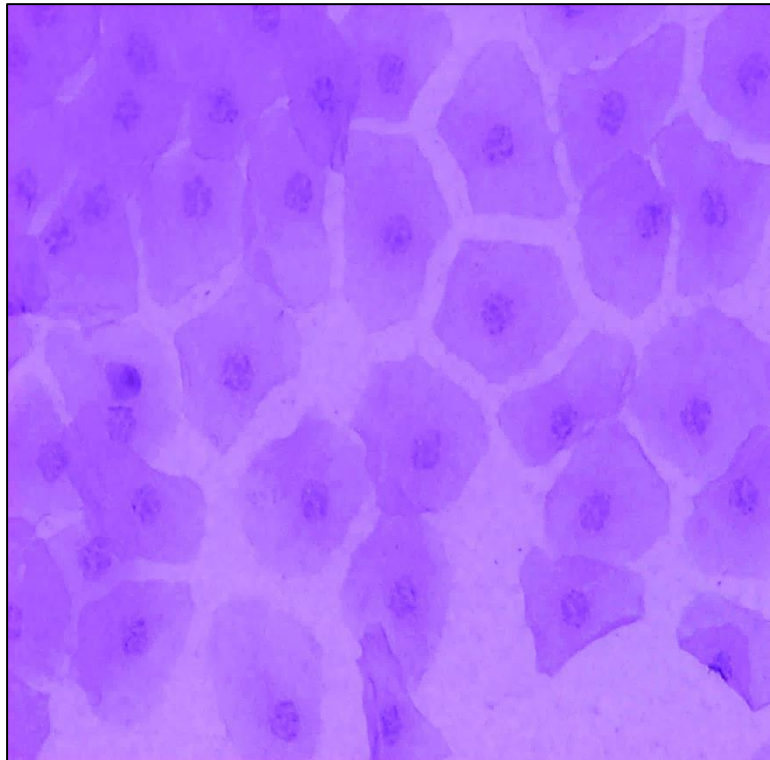


Figura 19. Citología de impresión corneal grupo I. Láminas de células poligonales con un citoplasma ligeramente basófilo y un núcleo pequeño, redondo y central con la cromatina finamente granular.
Tinción PAS-hematoxilina 20X

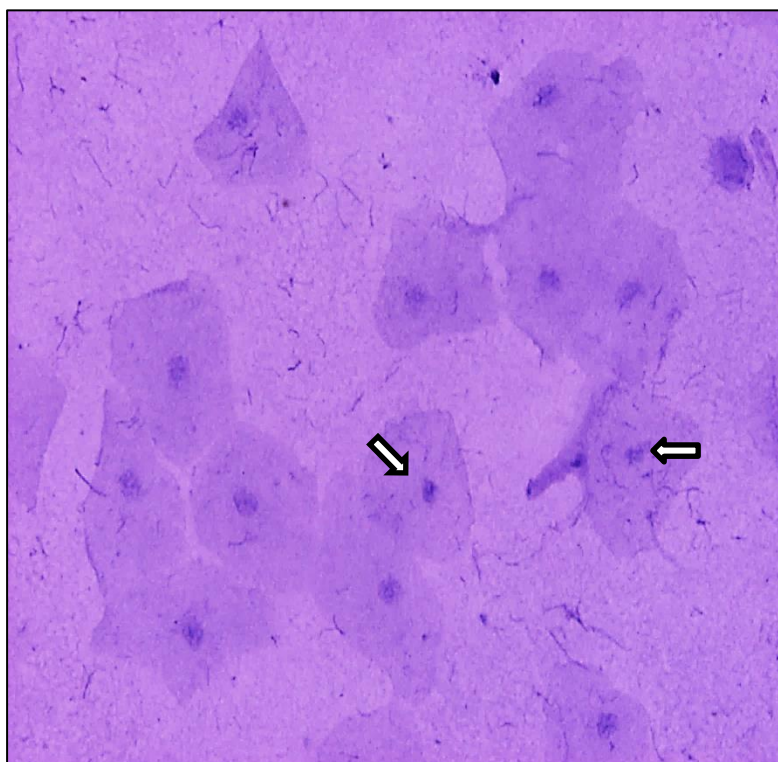


Figura 20. Citología de impresión corneal grupo I. Células con núcleo pequeño y picnótico (Flechas). Tinción PAS-hematoxilina 20X

Resultados

Se ha observado un escaso número de células caracterizadas por la presencia de un núcleo más excéntrico, muy pequeño y picnótico y un citoplasma grande y abundante. **(Figura 20)** Estas células han aparecido en un 50% de las muestras analizadas y han representado un 0.91% del recuento celular total.

En un 73.3% de las muestras se han observado células anucleadas, que han supuesto el 0.83% del recuento celular total **(Figura 21)** y en un 3.2% de las muestras se han apreciado células binucleadas, que han representado el 0.014% de la totalidad de las células estudiadas en el grupo I. **(Figura 22)**

En el 35.5% de las muestras se han encontrado células que contenían depósitos citoplasmáticos de pigmento color marrón que hemos identificado como melanina. Estas células han representado el 0.4% del recuento celular total. **(Figura 23)**

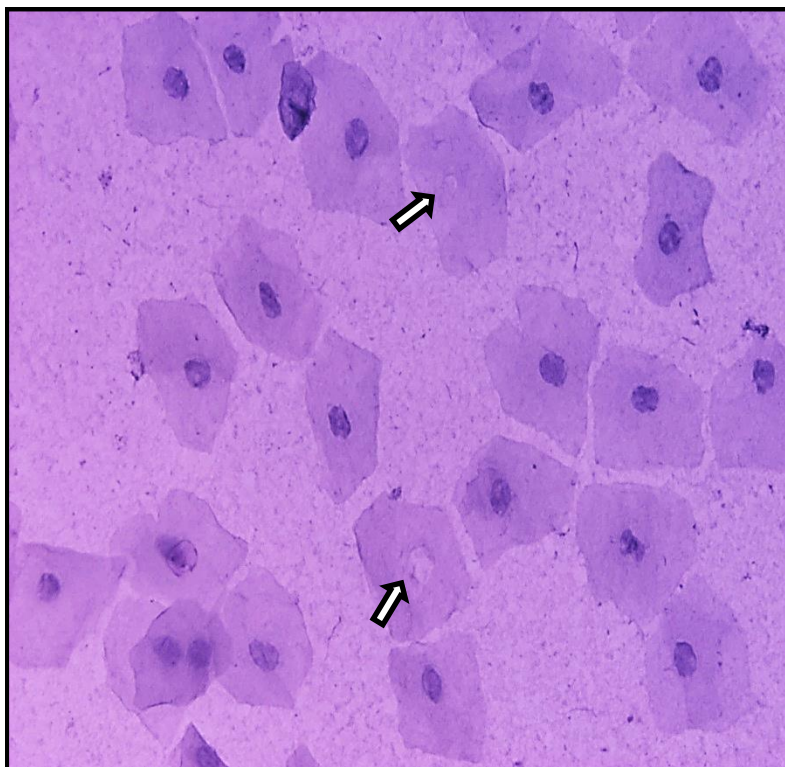


Figura 21. Citología de impresión corneal grupo I. Células anucleadas.
(Flechas) Tinción PAS-hematoxilina 20X

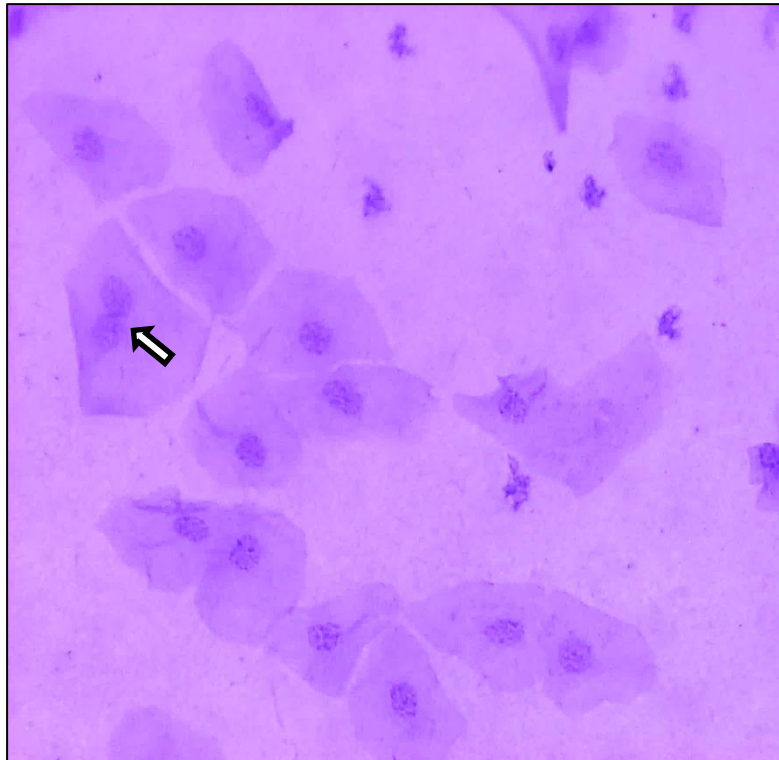


Figura 22. Citología de impresión corneal grupo I. Células con núcleos dobles. (Flecha) Tinción PAS-hematoxilina 20X

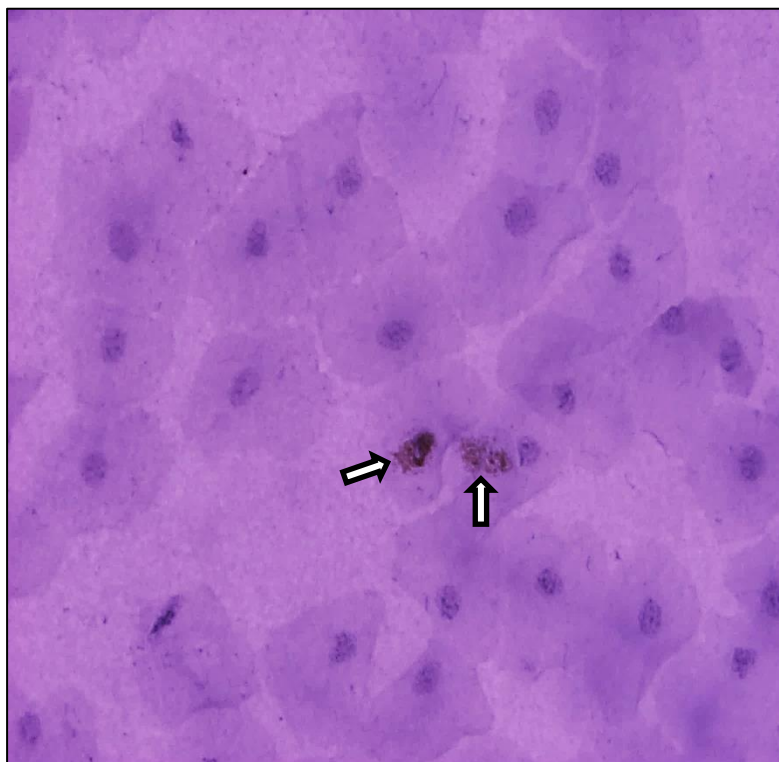


Figura 23. Citología de impresión corneal grupo I. Células con depósitos de melanina en el citoplasma. (Flechas) Tinción PAS-hematoxilina 20X

Resultados

Asimismo, en un 35.5 % de las muestras, se han visualizado células pequeñas y redondeadas con un citoplasma pequeño, más basófilo que las células superficiales corneales adyacentes y un núcleo redondo y central. Estas células han supuesto el 0.59% del recuento celular total. **(Figura 24)**

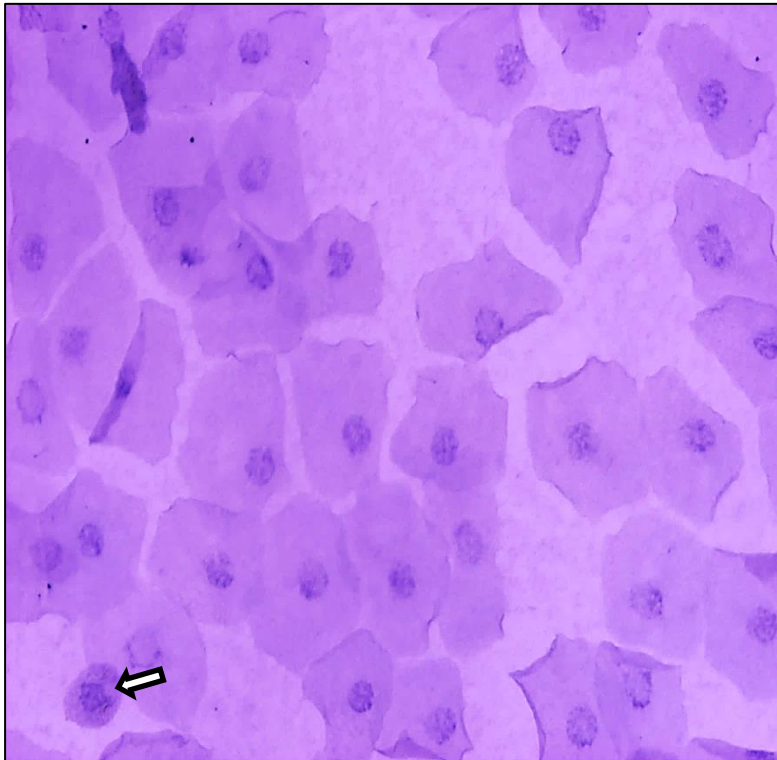


Figura 24. Citología de impresión corneal grupo I. Célula pequeña y redondeada con un citoplasma basófilo y un núcleo redondo y central. (Flecha) Tinción PAS-hematoxilina 20X

5.2.1.2. Grupo II

Las citologías corneales del grupo II se han caracterizado por la presencia de láminas de células epiteliales integradas por un número de células, menor que en el grupo I, y que ha variado, en la mayoría de las citologías entre 10 y 40 células por campo.

Se han encontrado diversos patrones de organización celular entre los que destacan:

- Láminas de células uniformemente dispuestas con grandes espacios intercelulares.
- Extensas agrupaciones de células superpuestas o agrupadas de forma irregular.
- Presencia de células aisladas.

Aunque morfológicamente las células de este grupo han presentado mayor heterogeneidad, el 72% de las células estudiadas se han caracterizado por tener una forma poligonal, con un citoplasma abundante y ligeramente basófilo, y un núcleo pequeño, redondo y de localización central o ligeramente excéntrico. **(Figura 25)**

El área celular media ha sido de 1262.7 μm^2 (DE 303.7), el área nuclear media de 83.1 μm^2 (DE 22.4) y han presentado un ratio N:C de 1:16.8 (DE 3.6).

Se han encontrado diferencias significativas de tamaño entre ellas y en muchos casos se han observado células plegadas y con los bordes citoplasmáticos irregulares. **(Figura 26)**

Un gran número de células han presentado cambios a nivel nuclear caracterizados por la presencia de un núcleo muy pequeño y algo excéntrico con la cromatina muy condensada y que se ha asociado con procesos de apoptosis celular. Este tipo celular se ha identificado en un 96.5% de las muestras analizadas y ha representado el 17.8% del recuento celular total del grupo II. **(Figura 27)**

En un 96.5% de las muestras se han identificado células anucleadas y han representado el 8.74% del recuento celular total. **(Figura 28)** También se han observado células binucleadas en un 68.96% de las muestras, que han supuesto el 0.49% del total de las células estudiadas del grupo II. **(Figura 29)**

En cuanto a cambios a nivel citoplasmático, se han encontrado células con depósitos de melanina en su citoplasma. Estas células han representado el 6% del total de las células del grupo II y han aparecido en un 79.3% de las citologías estudiadas. **(Figura 30)**

También se ha observado la presencia de células pequeñas, de forma redondeada, con un citoplasma menos abundante y más basófilo y un núcleo redondo y central. Estas células se han identificado en el 62% de las citologías y han representado el 1.18% del recuento celular total. **(Figura 31)**

Otra característica destacable en las citologías de los animales del grupo II, ha sido la presencia en el 67.4 % de las muestras de restos de células inflamatorias, identificadas como neutrófilos, localizadas en el espacio intercelular. **(Figura 32)**

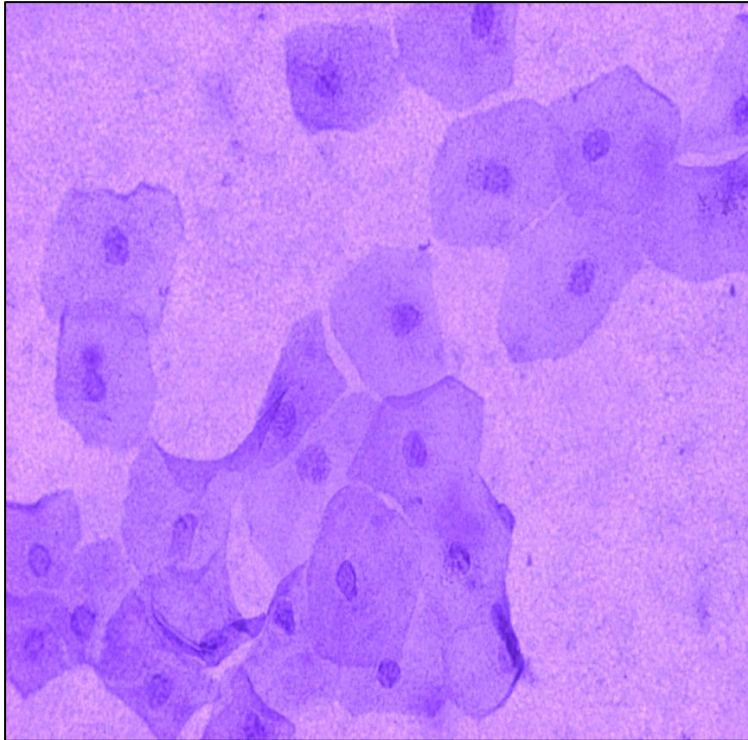


Figura 25. Citología de impresión corneal grupo II. Células poligonales con un citoplasma grande y ligeramente basófilo y un núcleo pequeño y redondo.
Tinción PAS-hematoxilina 20X

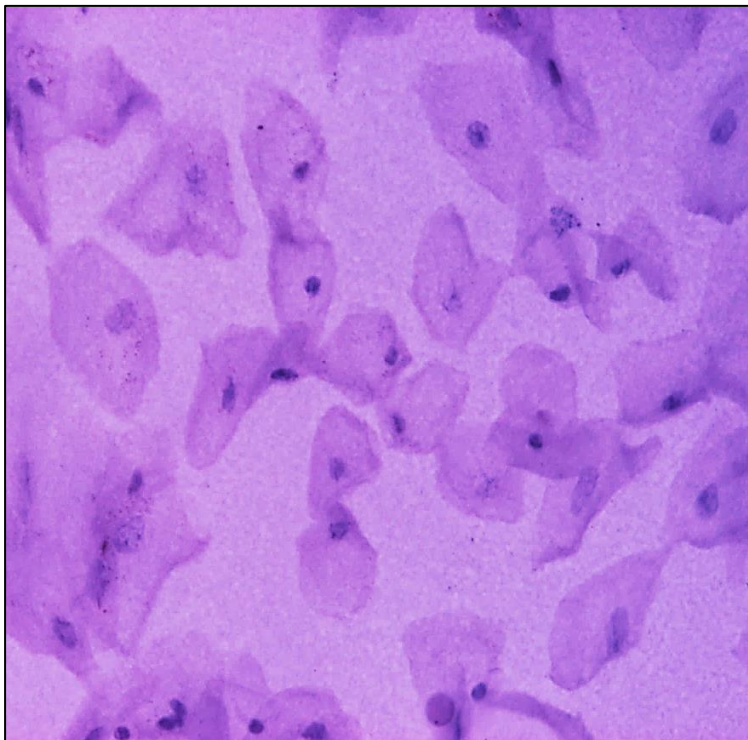


Figura 26. Citología de impresión corneal grupo II. Gran heterogeneidad celular. Células con diferentes tamaños nucleares y citoplasmáticos, abundantes células con pliegues y bordes citoplasmáticos irregulares.
Tinción PAS-hematoxilina 20X

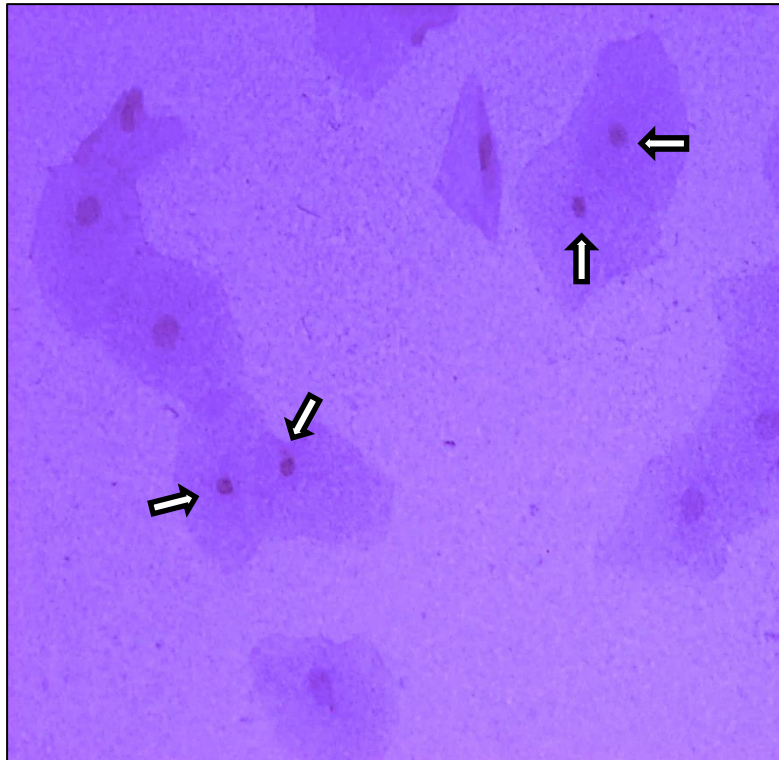


Figura 27. Citología de impresión corneal grupo II. Células con un núcleo muy pequeño y cromatina muy condensada. (Flechas) Tinción PAS-hematoxilina 20X

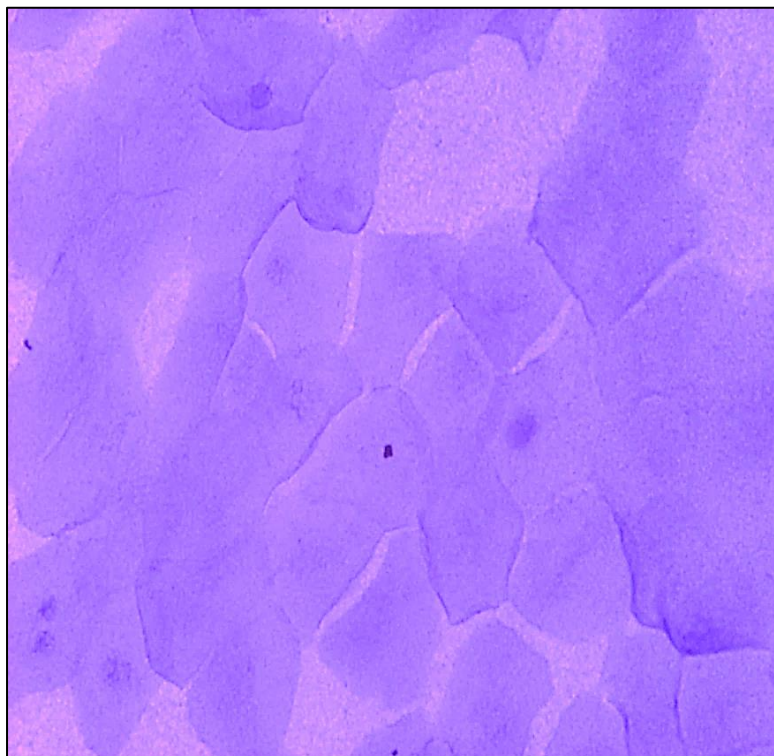


Figura 28. Citología de impresión corneal grupo II. Agrupación de células anucleadas. Tinción PAS-hematoxilina 20X

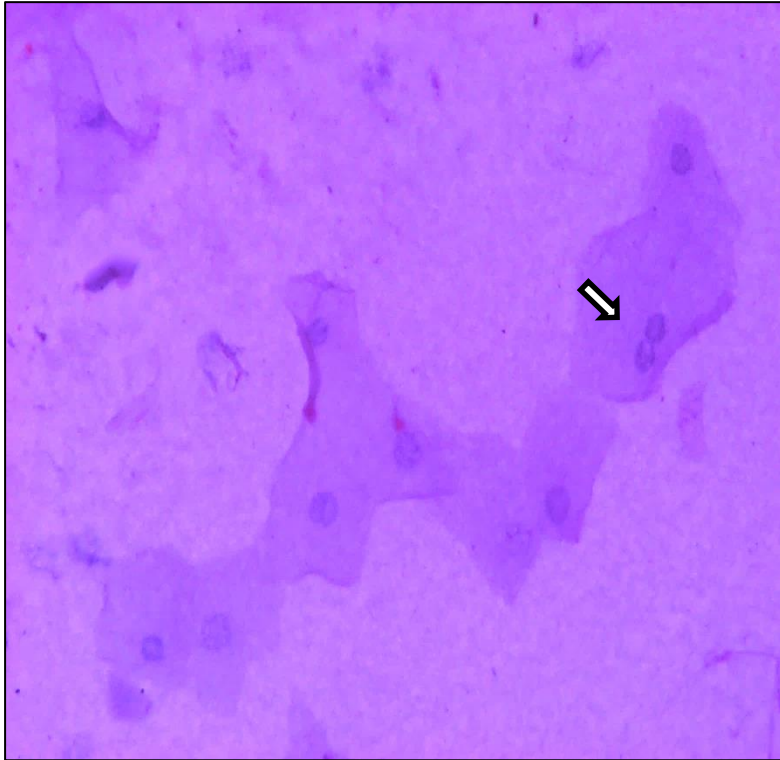
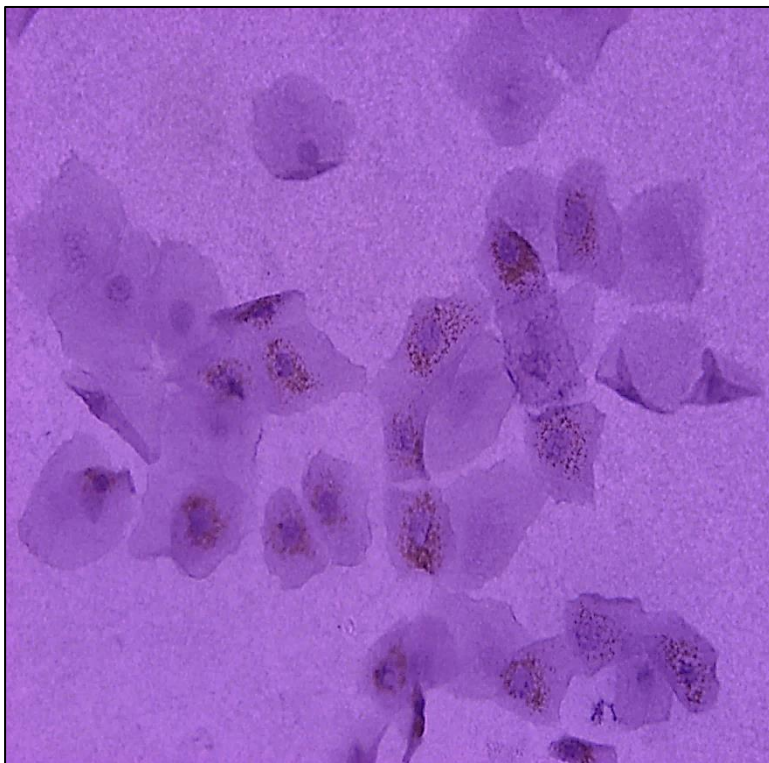


Figura 29. Citología de impresión corneal grupo II. Célula binucleada.
(Flecha) Tinción PAS-hematoxilina 20X



**Figura 30. Citología de impresión corneal grupo II. Células con depósitos
citoplasmáticos de melanina. Tinción PAS-hematoxilina 20X**

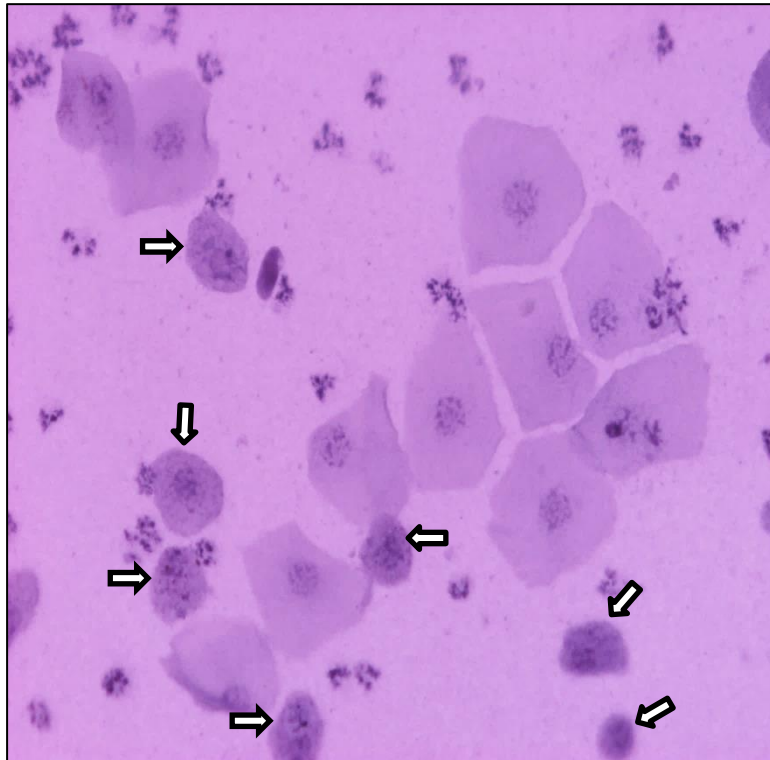


Figura 31. Citología de impresión corneal. Grupo II. Células pequeñas, de forma redondeada, citoplasma basófilo y núcleo redondo. (Flechas)
Tinción PAS-hematoxilina 20X

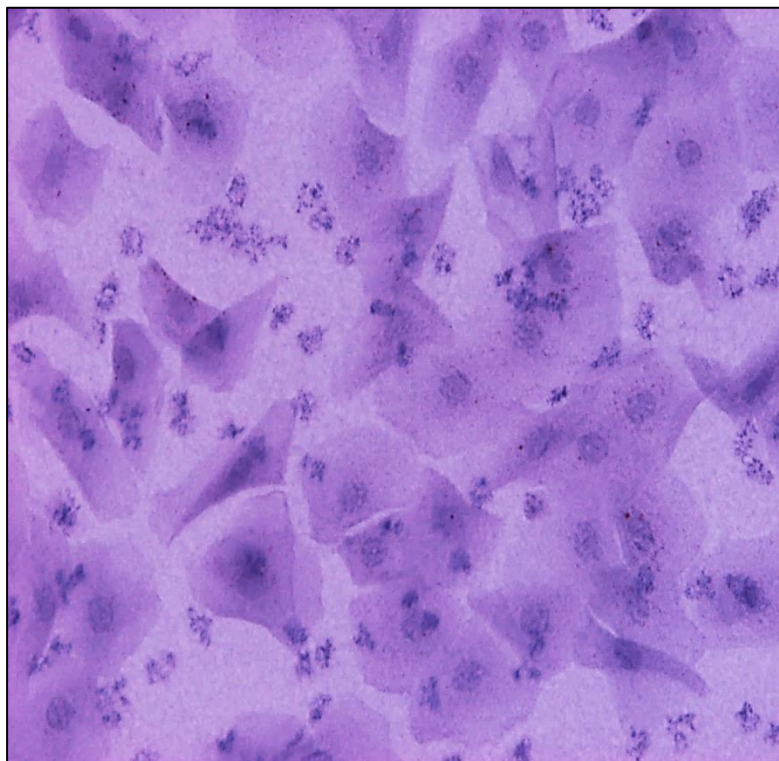


Figura 32. Citología de impresión corneal. Grupo II. Restos de células inflamatorias localizadas en el espacio intercelular.
Tinción PAS-hematoxilina 20X

5.2.2. Análisis comparativo de los resultados del estudio morfométrico celular

Tal y como ya se ha especificado en el apartado de material y métodos para el estudio morfométrico de las muestras hemos analizado los siguientes parámetros:

- Tamaño celular.
- Tamaño nuclear.
- Ratio núcleo: citoplasma (N:C).
- Presencia de alteraciones nucleares.
- Presencia de otros tipos celulares.
- Presencia de células pigmentadas.

Se ha realizado un recuento celular de 14.200 células, 7.100 células por grupo. Con estos datos se ha determinado el porcentaje de animales de cada grupo que presentaba alteraciones celulares (**Gráfico 4**), el número de células con alteraciones estructurales (**Gráfico 5**) y el porcentaje de células con alteraciones con respecto al recuento celular total de cada grupo. (**Gráfico 6**)

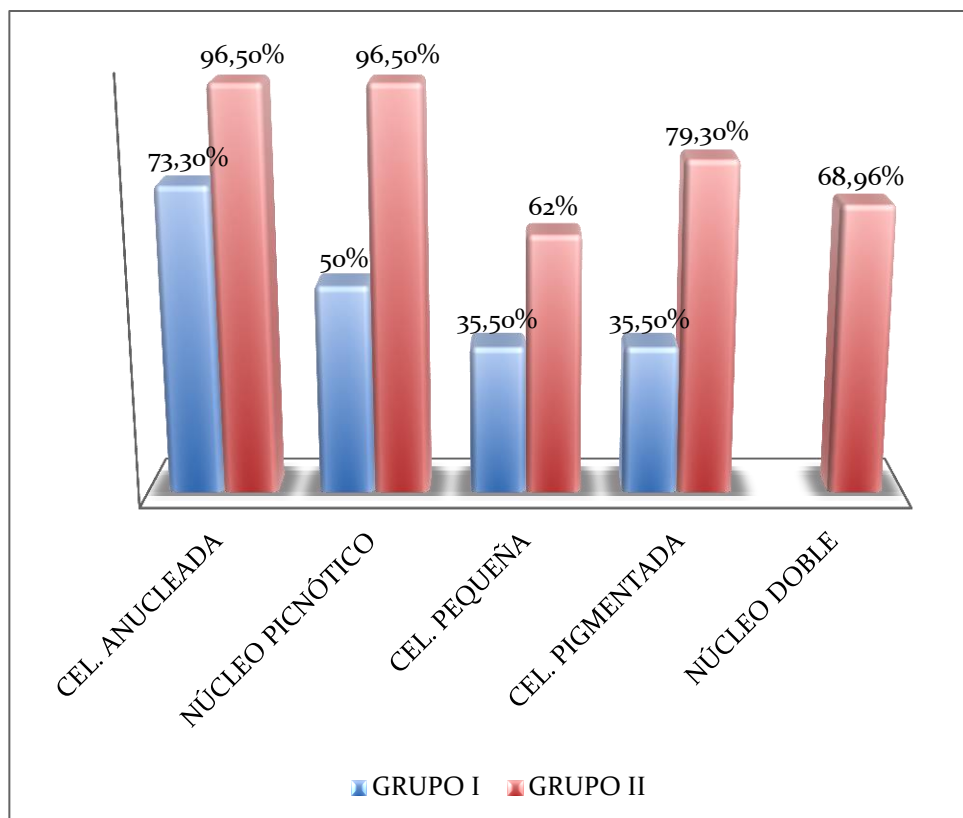


Gráfico 4. Porcentaje de animales de cada grupo que han presentado alteraciones celulares.

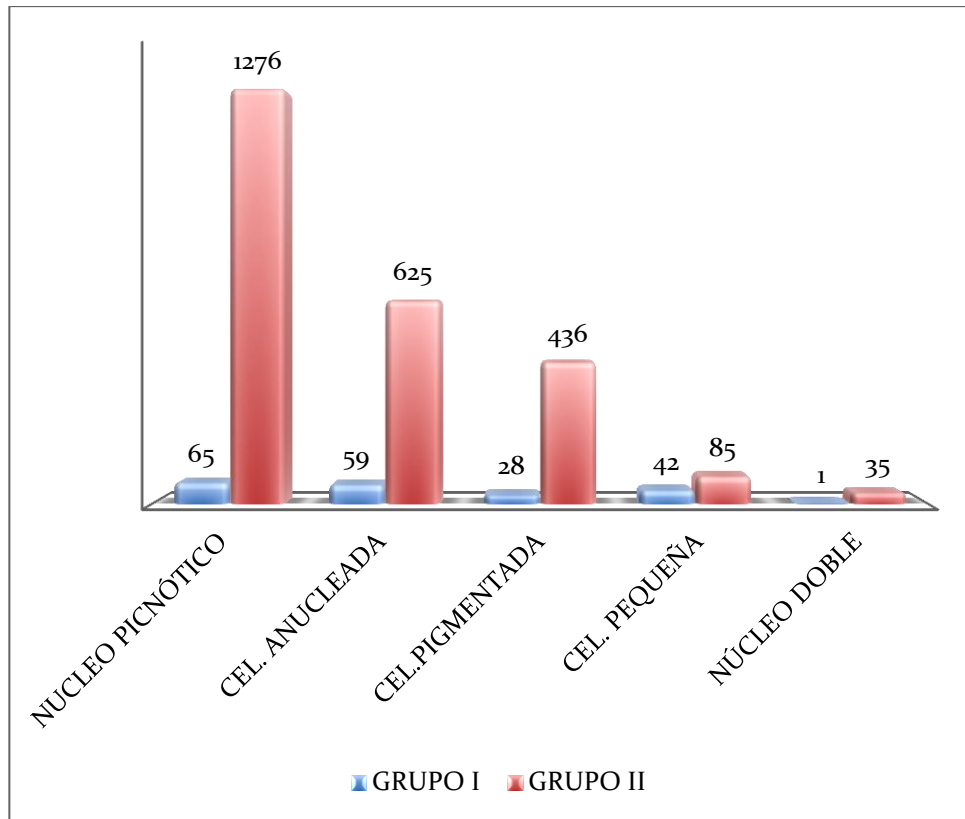


Gráfico 5. Número de células con alteraciones estructurales por grupo.

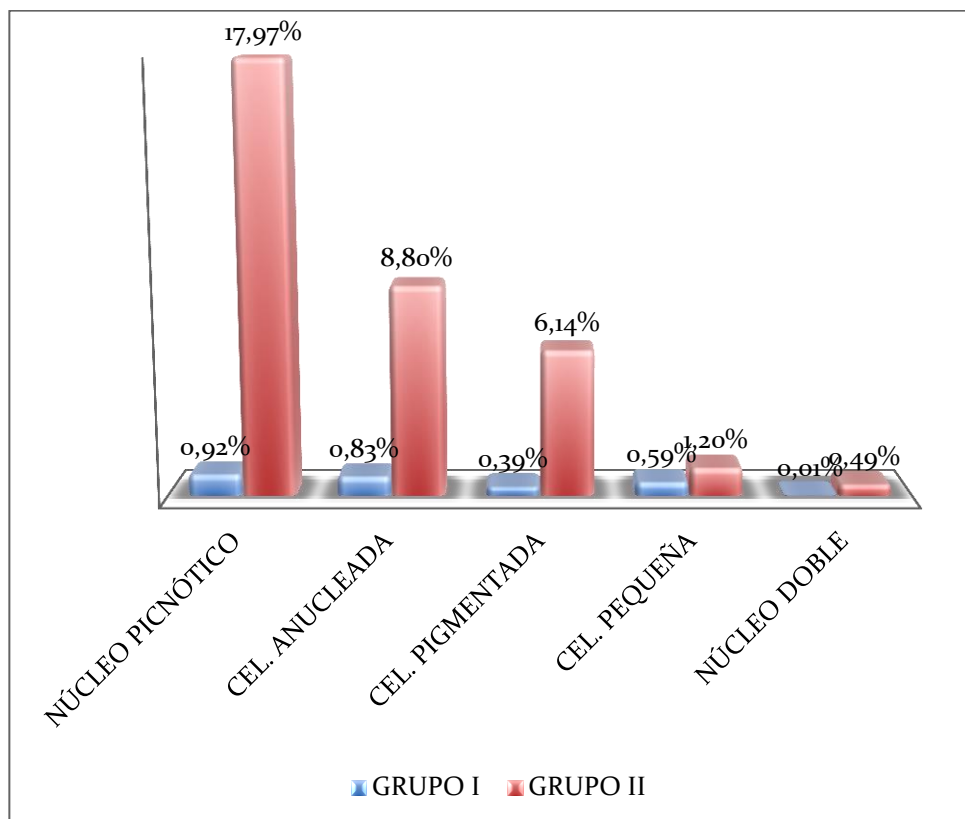


Gráfico 6. Porcentaje de células con alteraciones estructurales por grupo.

5.3. Análisis estadístico

5.3.1. Estudio comparativo de las medidas celulares entre los ojos derecho e izquierdo de todos los individuos incluidos en el estudio

Con el objetivo de establecer la independencia entre los ojos derecho e izquierdo de todos los animales incluidos en el estudio para los parámetros citoplasma, núcleo y ratio N:C, se ha empleado la prueba estadística T de Student.

El análisis de los datos ha establecido que para estos tres parámetros no existen diferencias significativas ($P>0.05$) entre los ojos derecho e izquierdo del mismo animal. Por lo tanto los cálculos estadísticos para el estudio morfométrico de las muestras se han llevado a cabo con la media de las medidas del núcleo, citoplasma y ratio N:C de ambos ojos conjuntamente.

Se ha utilizado la prueba de correlación de Pearson para ver si existe relación entre los ojos izquierdo y derecho de todos los individuos incluidos en el estudio para los parámetros núcleo, citoplasma y ratio N:C, y se ha establecido que existe una correlación positiva de moderada a alta y muy significativa ($P<0.0001$) entre los ojos izquierdo y derecho.

Esto significa que las medidas del núcleo, citoplasma y ratio N:C no son variables independientes para cada ojo y que tienen una concordancia positiva de moderada a alta.

5.3.2. Estudio comparativo de las medidas celulares entre el grupo I y el grupo II

Para el análisis comparativo entre las medias de las áreas de los parámetros núcleo, citoplasma y el ratio N:C entre los grupos I y II se ha utilizado la prueba T de Student.

Los resultados han evidenciado que la diferencia de las medidas celulares entre ambos grupos es estadísticamente muy significativa ($P<0.0008$). Las células corneales de los animales del grupo I han presentado un tamaño citoplasmático y nuclear mayor pero un ratio N:C proporcionalmente menor que las del grupo II, las cuales se han caracterizado por ser más pequeñas y con un núcleo considerablemente menor que las del grupo I. **(Gráfico 6)**

Se añade tabla descriptiva con los datos de las medias de las medidas celulares por perro. **(Anexo 1)**

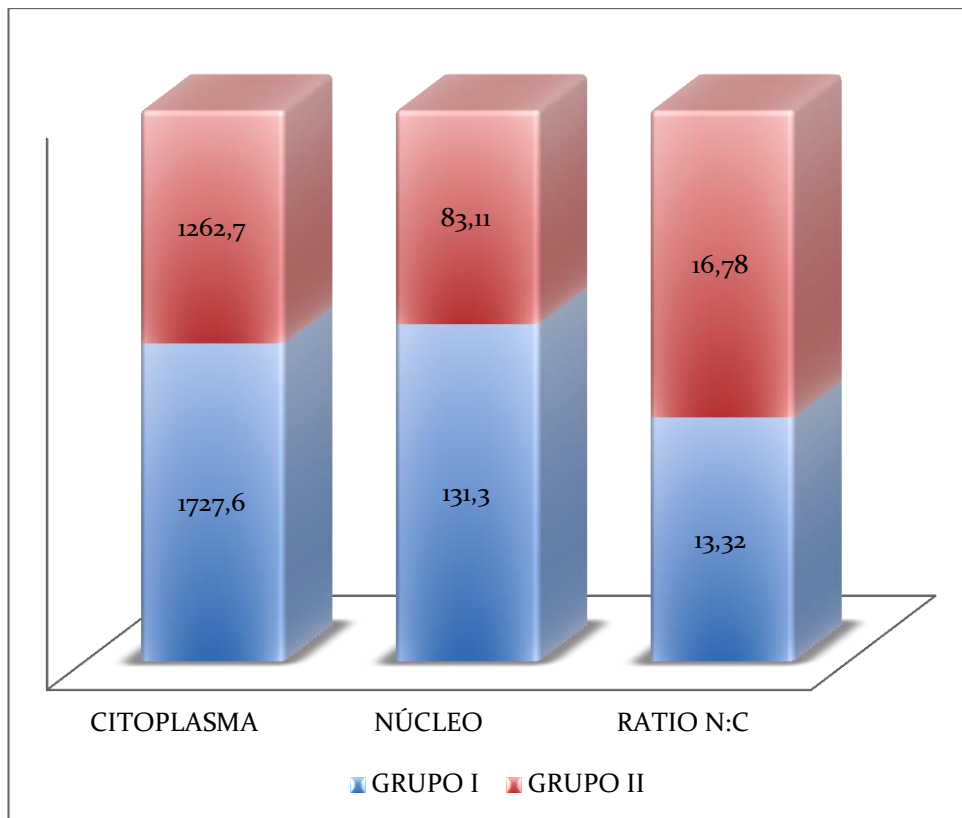


Gráfico 6. Gráfico comparativo de la media de las medidas del área del núcleo y el citoplasma en μm^2 y del ratio N:C de las muestras del grupo I y el grupo II.

5.3.3. Correlación entre la PLS I y las medidas celulares del citoplasma, núcleo y ratio N:C

Para determinar la existencia de una asociación entre la PLS I y las medidas morfométricas celulares de todos los animales incluidos en el estudio (grupo I y grupo II) se ha utilizado la prueba de correlación de Spearman.

Debido a que cada ojo ha presentado una medida diferente en la PLS I, se han empleado en este caso los valores de la PLS I de cada ojo por separado y se han comparado con la media de las medidas celulares registradas para ese ojo. **(Gráfico 7)**

El estudio estadístico ha establecido una correlación positiva moderada ($r=0.656$ y $r=0.696$) y muy significativa ($P<0.0001$) entre los valores de la PLS I y las medidas citoplasmáticas y nucleares de las células corneales respectivamente, y una correlación negativa moderada ($r=-0.48$) y muy significativa ($P<0.0001$) entre los valores de la PLS I y la medida del ratio N:C.

Resultados

El análisis de los datos permite interpretar que existe una relación entre las medidas de la PLS I y la magnitud del área citoplasmática, nuclear y del ratio N:C, de tal modo que cuanto menores son los valores obtenidos en la PLS I menores son las medidas celulares correspondientes al núcleo y citoplasma de las células de la superficie corneal y mayor es el ratio N:C.

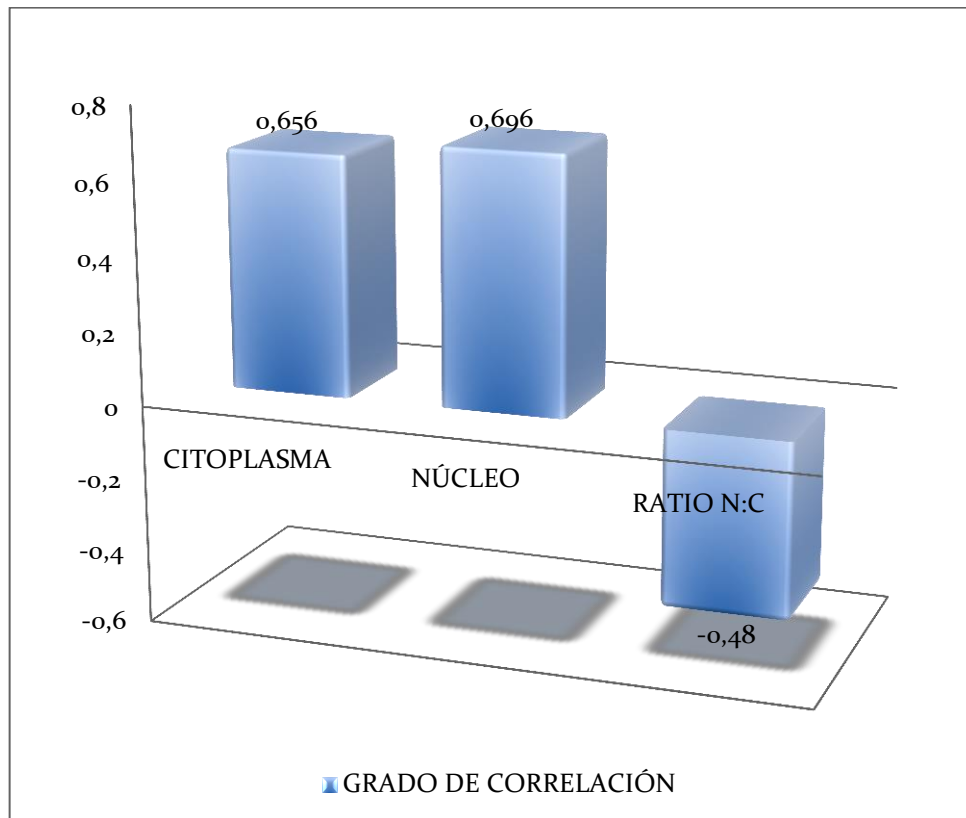


Gráfico 7. Grado de correlación entre la PLS I y las medidas de núcleo, citoplasma y ratio N:C de todos los animales incluidos en el estudio.

5.3.4. Correlación entre la PLS I y alteraciones celulares

Para establecer si existe alguna relación entre la PLS I y la presencia de determinadas alteraciones celulares en la superficie corneal (núcleos picnóticos, núcleos dobles, células pequeñas, células anucleadas y células pigmentadas) se ha empleado el coeficiente de correlación de Spearman.

El análisis de los datos ha establecido una correlación negativa de moderada a alta ($-0.71 > r < -0.4$) con un nivel de significación muy alto ($P < 0.0001$) entre los valores obtenidos en la PLS I de todos los individuos y la presencia de alteraciones celulares corneales en las muestras estudiadas.

La interpretación del estudio permite establecer una asociación negativa entre los valores obtenidos en la PLS I por los animales incluidos en este estudio y la presencia de alteraciones celulares en sus córneas, de tal manera que la cantidad de células con alteraciones se incrementa cuando los valores de PLS I son menores.

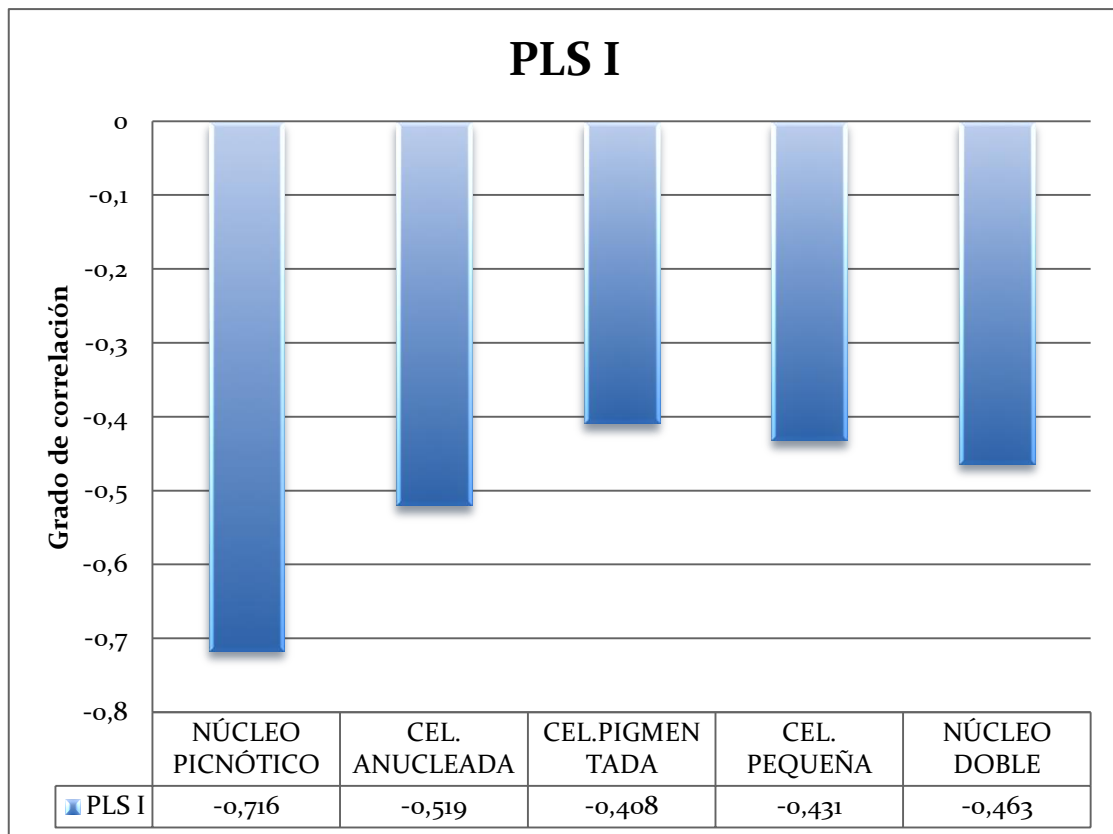


Gráfico 8. Grado de correlación entre la PLS I y la presencia de alteraciones celulares en la superficie corneal.

5.3.5. Correlación entre la PLS I y alteraciones celulares en el grupo II según la gravedad de la QCS

El grupo II ha sido dividido en 3 subgrupos en función de los valores obtenidos en la PLSI:

- QCS grave: valores en la PLS I ≤ 5 mm/min.
- QCS moderada: valores en la PLS I entre 6 y 10 mm/min.
- QCS leve o subclínica: valores en la PLS I entre 11 y 14 mm/min.

Se ha realizado la prueba de Kruskal-Wallis para comparar estos subgrupos entre sí y determinar si existen diferencias significativas entre ellos cuando se correlacionan con alteraciones de las células de la superficie corneal (presencia de núcleos picnóticos, células anucleadas, células pigmentadas, células con núcleos dobles y células pequeñas). Se ha establecido que solo existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre alguno de los subgrupos en el caso de la presencia de núcleos picnóticos ($P=0.0009$) y de células anucleadas ($P=0.0037$).

Para establecer entre qué subgrupos existen diferencias significativas se ha realizado un test no paramétrico de comparaciones múltiples que ha determinado que existen diferencias significativas entre el grupo con QCS leve y severa ($P=0.00019$), y entre los grupos con QCS moderada y severa ($P=0.01613$) en lo relativo a la presencia de núcleos picnóticos, y entre los grupos con QCS leve y moderada ($P=0.00302$) en lo que respecta a la presencia de células anucleadas.

Se ha realizado el test de suma de rangos de Wilcoxon para comparar el subgrupo de los animales con el grado de QCS leve, (PLS I 11-14 mm/min) con los animales del grupo I (PLS I ≥ 15 mm) en lo que respecta a la presencia de núcleos picnóticos y células anucleadas en las células de la superficie corneal de estos animales. No se han encontrado diferencias en el número de células anucleadas entre ambos grupos, pero sí se han establecido diferencias muy significativas ($P < 0.0001$) en el número de núcleos picnóticos, con una media de 4.4 ± 2.1 células con núcleos picnóticos por muestra en el grupo de animales con QCS leve (PLS I 11-14 mm/min) y de 1.1 ± 2.4 células con núcleos picnóticos por muestra en el caso de animales con una producción lagrimal normal (PLS I ≥ 15 mm/min).

DISCUSIÓN

La citología de impresión es una herramienta muy útil para la obtención de células de la superficie ocular. Es una técnica no invasiva, indolora, económica, accesible y fácil de realizar.

Proporciona de manera constante gran cantidad de células con alto detalle celular^{10,81,250} capaces de ser procesadas y evaluadas por una amplia gama de técnicas laboratoriales,^{30,39} permitiendo tanto el diagnóstico como la monitorización frecuente de enfermedades que afectan a la superficie ocular.^{30,39,233,236}

La citología de impresión presenta indudables ventajas sobre las técnicas tradicionales de recogida de muestras de la superficie corneal como las biopsias, los raspados y las citologías con hisopos o microcepillos. Es una técnica no invasiva^{39,45,133,149} que preserva la morfología celular y permite estudiar las relaciones establecidas entre las células del estrato escamoso corneal.^{13,45,116,222,233,250}

En medicina humana la citología de impresión se ha venido utilizando en oftalmología desde su implantación en el año 1977^{60,236} y ha ido evolucionando, y ampliando su espectro en el diagnóstico de enfermedades oculares a lo largo del tiempo gracias a la introducción de nuevas membranas de filtración, a la implantación de nuevos protocolos de tinción y al desarrollo de nuevas tecnologías laboratoriales.

Diferentes autores han empleado y perfeccionado la técnica a lo largo del tiempo sin llegar a establecer un protocolo estandarizado seguido por todos. Esta falta de uniformidad ha limitado en gran medida el empleo de la citología de impresión como una prueba rutinaria en la clínica oftalmológica humana y veterinaria para el diagnóstico de enfermedades que afectan a la superficie ocular.

Entre los factores que han podido influir en la falta de uniformidad de los resultados obtenidos en los diferentes estudios, destacan, el empleo de anestésicos tópicos, la limpieza de la superficie ocular, las características físico-químicas de las membranas de filtración, la intensidad de presión y tiempo empleado para tomar la muestra y los instrumentos utilizados en el procedimiento.

En medicina veterinaria las principales limitaciones de la citología de impresión para el estudio de la superficie corneal son la dificultad de obtener muestras de buena calidad con los procedimientos habituales debido a la existencia, en muchas especies, de un tercer párpado capaz de desplazar la membrana de filtración desde el punto de aplicación, al reducido tamaño ocular de algunos animales y a la falta de colaboración de algunos pacientes.

A estas dificultades propias de la técnica hay que añadir, además, la escasez de estudios descritos en la bibliografía que permitan definir y comparar los parámetros morfométricos celulares normales y patológicos en las diferentes especies.

Discusión

El procedimiento desarrollado en este estudio facilita el sistema de recogida y manejo de las muestras, optimiza la técnica para su empleo en animales y minimiza cualquier tipo de lesión iatrogénica sobre la superficie ocular en comparación con los procedimientos de citología de impresión corneal convencionales.

El empleo de anestésicos tópicos previo al procedimiento de toma de muestras por citología de impresión es muy útil en oftalmología veterinaria, sin embargo, su empleo ha sido motivo de controversia en medicina humana ya que algún autor ha descrito que podría generar artefactos o alterar la morfología celular.²³⁶ En el presente trabajo se han empleado anestésicos tópicos como en la mayoría de los estudios consultados ^{6,10,18,19,41,45,46,51,59,79,160,161,167,196,203,204,205,233,237,240,243}, y se ha comprobado que su empleo facilita significativamente la toma de muestras y que la presencia de alteraciones celulares y artefactos asociados a su uso es mínima.

Martinez,¹⁴¹ en un intento de estandarizar la técnica de recogida de muestras de la superficie ocular, empleó membranas de acetato de celulosa con diferentes tamaños de poro (8, 3, 0.45, 0.22 y 0.025 μm) y demostró que el tamaño del poro era directamente proporcional a la cantidad de células obtenidas por muestra pero inversamente proporcional a la calidad de la preservación celular.

En este estudio se ha utilizado una membrana de filtración de acetato de celulosa con un tamaño de poro intermedio de 0.45 μm (Millipore HAWP304F0 MA), que ha permitido obtener una buena cantidad de células sin alteraciones de la morfología celular, confirmando lo que había sido descrito previamente por otros autores. ^{19,41,59,133,135,157,160,161,201,203,204,205,233,234}

En los últimos años la comercialización de una nueva membrana de filtración llamada Biopore® (Millicell-CM 0.4 μm PICM012550, de Millipore Corporation, Bedford, MA) compuesta de politetrafluoroetileno hidrofílico ha permitido incorporar al estudio citológico de la superficie ocular técnicas de biología molecular como la PCR^{35,188,256} y técnicas de tinción inmunohistoquímicas e inmunofluorescentes.^{10,18,46,51,237,240}

Las ventajas de Biopore® sobre las membranas de acetato de celulosa se ven contrarrestadas por su elevado precio, la dificultad de su manejo debido a su escaso espesor¹⁰ y por las posibles lesiones iatrogénicas derivadas de aplicar un anillo de plástico rígido sobre la superficie ocular, puesto que Biopore® se comercializa montada sobre una estructura plástica con unos soportes en su base que hay que romper con unas pinzas para no dañar la córnea al tomar la muestra.

Las membranas de filtración empleadas en este estudio han estado sumergidas en agua destilada siguiendo las indicaciones de De Nadai,⁴¹ quien comprobó, que el número de células recolectadas aumentaba de manera significativa si las membranas permanecían sumergidas en agua destilada desde el día anterior a la toma de muestras.

A pesar de que existen autores que no hacen referencia a cuál de las dos superficies de la membrana utilizan o que refieren que ambas caras de la membrana pueden ser utilizadas,^{167,243} en este estudio se ha empleado la superficie rugosa y mate de la membrana en un intento de obtener la mayor cantidad de células posible, tal y como especifican algunos autores.^{45,81,167}

La citología de impresión corneal es una técnica generalmente atraumática, sin embargo, la rigidez de los materiales empleados tradicionalmente para presionar la membrana de acetato de celulosa sobre la córnea tales como, oftalmodinamómetros^{79,141,169,203,222,263}, barritas de cristal o plástico^{60,167,182,196,237} y pinzas de cirugía entre otros,^{19,41,81,160,206,233} la hacen susceptible de provocar lesiones en la superficie ocular sobre todo en animales nerviosos o asustadizos. Por esta razón hemos desarrollado un dispositivo de toma de muestras adaptado a las particularidades de los pacientes de la consulta oftalmológica veterinaria.

El dispositivo empleado en este trabajo consta de un émbolo de plástico con un cilindro de goma blanda en un extremo sobre el que dispone la membrana de filtración. La simplicidad y seguridad del dispositivo ha permitido obtener muestras de la superficie corneal de todos los animales incluidos en este estudio de un modo fácil y exento de complicaciones, incluso en aquellos animales menos colaboradores.

Este dispositivo tiene la ventaja de que la membrana de filtración permanece adherida a su superficie en todo momento, lo cual permite obtener muestras más precisas comparado con los procedimientos clásicos. Tradicionalmente, desde el momento en el que se deposita la membrana sobre la superficie ocular hasta que se ejerce la presión sobre la misma, la membrana es susceptible de plegarse, desplazarse o caerse debido a movimientos oculares del animal, haciendo que haya que repetir el proceso.

En los animales, la existencia de un tercer párpado es una dificultad añadida a la toma de muestras con respecto a medicina humana. El desplazamiento de la membrana nictitante y la retracción del globo ocular en respuesta a la amenaza que representa la aplicación de un cuerpo extraño sobre la superficie ocular dificultan en gran medida la toma de muestras. La firme adherencia del microfiltro a la superficie del émbolo evita el efecto de arrastre de la membrana nictitante.

En el presente estudio, se ha aplicado el dispositivo durante 10 segundos sobre el área central de la córnea, un tiempo medio con respecto a los estudios de otros autores consultados que van desde 2 hasta 30 segundos,^{19,23,41,45,46,59,79,84,141,149,156,157,169,182,196,203,205,222,237} suficiente para asegurar la adherencia celular y que los animales hayan permanecido tranquilos y quietos en la mayoría de los casos. Sin embargo, en este estudio no ha sido posible determinar de manera objetiva la cantidad de presión ejercida sobre el globo ocular, a pesar de que Martínez¹⁴¹ estableció que una presión de 60 g era la que permitía obtener mejores resultados.

Discusión

Siguiendo las indicaciones de la mayoría de los autores consultados, se ha empezado a retirar la membrana de la superficie corneal desde uno de sus extremos para facilitar la descamación de las células epiteliales.^{19,45,60,77,59,81,141,161,233,243}

La técnica de fijación empleada, con etanol de 96°^{6,133,157,160,204,205} y la tinción utilizada con Ácido Periódico-Schiff (PAS)^{6,19,45,59,60,79,133,156,157,160,161,167,182,203,204,263} son técnicas contrastadas y empleadas por muchos de los autores consultados.

Los procedimientos de toma de muestras, fijación, tinción y montaje utilizados en este estudio han proporcionado un número suficiente de células bien preservadas y con una buena resolución del detalle celular.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo ha sido realizar un estudio descriptivo y comparativo de las características morfológicas y morfométricas las células de la superficie corneal de los animales incluidos en el grupo I y en el grupo II a partir de muestras obtenidas por citología de impresión.

En la bibliografía consultada no se ha encontrado ningún estudio previo en el que se haya realizado un análisis morfométrico y morfológico detallado de las células escamosas del epitelio corneal en perros sanos a partir de muestras obtenidas por citología de impresión.

El estudio microscópico de las muestras de los animales del grupo I se ha caracterizado por la presencia de láminas de células epiteliales grandes y muy homogéneas con escasos espacios intercelulares. Presentaron una forma poligonal con un citoplasma grande y ligeramente basófilo, y un núcleo pequeño, redondo y central, con la cromatina finamente granular y uniformemente distribuida. Estas características celulares se corresponden con el grado 0 de metaplasia escamosa descrita por Murube y Rivas, a partir de muestras obtenidas de la superficie ocular por citología de impresión, para establecer una correlación entre el grado de metaplasia escamosa y la severidad de los signos clínicos de pacientes humanos con QCS.^{160,161}

La morfología de las células superficiales del epitelio corneal del perro ha sido descrita por Kafarnik,¹⁰¹ empleando microscopía confocal, como células poligonales, con núcleos bien visibles y bordes celulares bien definidos. Esta descripción coincide con los resultados obtenidos en este estudio en los animales del grupo I y con lo descrito por diferentes autores en estudios realizados en gatos,¹⁰¹ conejos,^{53,200} bovinos,⁵² caballos,¹²³ cobayas²⁷ y humanos²⁰³.

En el presente estudio se han valorado una serie de características celulares tales como el área celular, el área nuclear, el ratio N:C, la presencia alteraciones nucleares, la pigmentación celular y la presencia de otros tipos celulares.

Las células del epitelio corneal de los animales del grupo I han presentado un área celular media de $1727.6 \mu\text{m}^2$ (DE 232.5), un área nuclear media de $131.3 \mu\text{m}^2$ (DE 14.1) y un ratio N:C de 1:13.3 (DE 1.5).

No se ha encontrado ningún estudio en el que se haya determinado el área celular de las células escamosas de la córnea de perros sanos; solo es destacable el estudio de Kafarnik realizado con microscopía confocal, en el cual estableció que las medidas de las células superficiales corneales de perros sanos oscilaban entre 40 y 50 μm de longitud.¹⁰¹ En trabajos realizados en otras especies, como caballos,¹²³ conejos,^{129,200} gatos¹⁰¹ o humanos,^{126,202,203} los autores han calculado la longitud y el grosor celular, pero no el área celular.

Son pocos los autores que han calculado el área de las células de la superficie corneal sana, y los resultados obtenidos en los diferentes estudios son dispares entre especies e incluso dentro de una misma especie. Doughty empleando microscopía electrónica de barrido (SEM), determinó el área celular media en bovinos⁵² ($1748 \pm 1169 \mu\text{m}^2$) y en conejos⁵³ ($625 \pm 516 \mu\text{m}^2$), Julio Morán⁹⁸ también la determinó en conejos empleando el mismo sistema de magnificación (SEM), ($355.73 \pm 288.56 \mu\text{m}^2$) y Murube¹⁶¹ obtuvo el área celular en humanos a partir de muestras estudiadas con microscopía óptica ($322.41 \pm 34.08 \mu\text{m}^2$).

Las citologías de impresión del grupo II se han caracterizado por presentar un menor número de células que el grupo I y una distribución celular irregular, con espacios intercelulares cada vez mayores hasta dar la apariencia de células aisladas. Estos resultados coinciden con los descritos por Murube y Rivas donde quedaron establecidos los diferentes grados de metaplasia escamosa en pacientes humanos con síndrome de ojo seco.^{160,161}

La mayoría de las células del grupo II han mantenido una morfología poligonal, con un núcleo pequeño, redondo y de localización central y un abundante citoplasma ligeramente basófilo con bordes irregulares en muchos casos. El área celular media de ha sido de $1262.7 \mu\text{m}^2$ (DE 303.7), el área nuclear media de $83.1 \mu\text{m}^2$ (DE 22.4) y un ratio N:C de 1/16.8 (DE 3.6).

Existe una diferencia muy significativa entre las medidas celulares medias de ambos grupos. Las células corneales de los animales del grupo I han presentado un tamaño citoplasmático y nuclear mayor y un ratio N:C proporcionalmente menor que las del grupo II, las cuales se han caracterizado por tener un citoplasma más pequeño y un núcleo considerablemente menor que las del grupo I.

La metaplasia escamosa es un mecanismo de respuesta adaptativa a menudo reversible de algunos epitelios ante agresiones externas o estímulos patogénicos del propio organismo que desarrollan procesos de queratinización, hiperplasia epitelial, pigmentación, fibrosis subepitelial y vascularización. Es decir, la córnea sufre una transformación hacia un tejido que recuerda a la piel aunque con la ausencia de folículos

Discusión

pilosos. Dependiendo de la naturaleza de la agresión pueden aparecer todos o sólo algunos de los cambios característicos.^{30,135,148}

La presencia de cambios metaplásicos en la superficie corneal de individuos afectados por QCS está descrita en la bibliografía^{161,204} y ha sido asociada a alteraciones vasculares que impiden la llegada de los factores circulantes encargados de la normal diferenciación del epitelio y a procesos inflamatorios que capaces de introducir factores que facilitan las alteraciones epiteliales.²⁴²

Murube y Rivas demostraron la existencia de una correlación entre la severidad de los signos clínicos de pacientes con síndrome de ojo seco y el grado de metaplasia escamosa de las células de la superficie corneal y conjuntival. Las células corneales afectadas se caracterizaron por presentar un aumento progresivo del área celular, del ratio N:C y por un incremento de alteraciones nucleares manifestadas en forma de núcleos dobles, picnóticos, líticos o ausencia de los mismos. También describieron un incremento de los espacios intercelulares hasta llegar al aislamiento celular en los estadios más avanzados y una modificación de la tinción del citoplasma que pasaba de eosinofílica a basófila a medida que el proceso se agravaba.^{160,161}

En este estudio, el 50% de las muestras obtenidas de las córneas de los animales del grupo I (0.91% del recuento celular total del grupo I) y el 96.5% de las muestras analizadas del grupo II (17.8% del recuento celular total del grupo II) han presentado células con signos de alteración celular caracterizadas por la presencia de núcleos muy pequeños y excéntricos con la cromatina muy condensada, y citoplasmas grandes y abundantes. Sin embargo, al contrario que Murube y Rivas^{160,161}, en este estudio no se han hallado diferencias en las tinciones citoplasmáticas entre las células de los grupos I y II, que han resultado basófilas en ambos casos.

En el grupo II se ha encontrado una disminución del área nuclear media y un aumento del ratio N:C, resultados que coinciden con los trabajos de Murube y Rivas.^{160,161} Sin embargo, se ha observado que en el grupo II existe una disminución del área celular media con respecto al grupo I, hecho que difiere con los resultados obtenidos por estos autores, que observaron un incremento del área celular media a medida que aumenta el grado de metaplasia escamosa celular, pero concuerda con las investigaciones de autores como Lemp, Ren y Wilson y Estil que han descrito en sus estudios una disminución del tamaño celular en superficies corneales sometidas a un incremento de la renovación celular.^{62,127,199,200}

Lemp, en un estudio realizado en personas con QCS utilizando microscopia especular, introdujo el concepto de que además de los movimientos celulares descritos en la teoría X, Y, Z de Thoft y Friend²³⁸ para el mantenimiento de la integridad de la superficie corneal, existe un movimiento celular desde las capas más profundas hacia la superficie de la córnea. Las células de las capas más profundas tienen menor tamaño que las células superficiales, pero una vez que alcanzan la superficie, la exposición al medio exterior hace que aumenten de tamaño, se aplanen y finalmente se descamen.¹²⁷

La presencia de mayor proporción de células pequeñas en la superficie corneal asociada a la retención de fluoresceína sódica, indicativa de una alteración de las membranas celulares, se ha sugerido que puede ser debida a un incremento del recambio celular con células provenientes de estratos inferiores, asociado a una senescencia prematura de las células de la superficie corneal junto con una disminución del tiempo de residencia de las mismas en la superficie ocular.¹²⁷

Enfermedades de la superficie ocular como la QCS pueden provocar un aumento del ritmo de recambio celular secundario a la desecación, a la hiperosmolaridad de la lágrima y/o a un descenso de la lubricación con incremento de las fuerzas de rozamiento del párpado sobre la superficie ocular, lo que podría explicar la mayor presencia de células de menor tamaño provenientes de capas inferiores como se ha descrito en este estudio.^{108,204}

Otra teoría que puede explicar el menor tamaño del área citoplasmática de las células del grupo II está relacionada con los procesos de apoptosis que experimentan las células de la superficie corneal. Ren y Wilson^{199,200} estudiaron la viabilidad de las células de la superficie corneal en conejos, empleando tinciones inmunocitoquímicas para determinar la presencia de apoptosis celular. Observaron que después de someter a la superficie corneal a un proceso descamativo durante horas mediante una perfusión constante con suero fisiológico, entre las células descamadas encontraban mayor cantidad de células redondeadas y de menor tamaño que las que obtenían en el grupo control cuya superficie corneal no había estado sometida a fuerzas de rozamiento. Estas observaciones coincidían con las realizadas por Lemp.¹²⁷

En un trabajo posterior, Estil⁶² estudió la descamación forzada de las células de la superficie corneal empleando una lentilla de contacto en pacientes humanos y observó que con cada repetición del proceso se obtenía mayor cantidad de células y cada vez más pequeñas.

La disminución del tamaño celular podría haber quedado explicada por la obtención de células de capas más profundas como había sugerido Lemp¹²⁷, pero Estil estudió la posibilidad de que este proceso fuera debido a mecanismos apoptóticos como habían descrito previamente Ren y Wilson en otro estudio.^{62,200}

Estil observó que un pequeño porcentaje de las células de la superficie corneal se desprendían por apoptosis clásica, caracterizada, en los estadios iniciales, por la presencia de células con unos pequeños cuerpos apoptóticos de origen citoplasmático adheridos a su superficie que eran los responsables de la reducción del tamaño celular.

En este estudio no se han encontrado células con cuerpos apoptóticos adheridos a la superficie celular, por lo que no se ha podido confirmar que la reducción del tamaño celular se deba a este tipo de muerte celular programada.

Estil determinó que la mayoría de las células de la superficie corneal se desprendían por un mecanismo que llamó apoptosis no clásica. Estas células eran morfológicamente similares a las células normales pero de menor tamaño, aunque a nivel histoquímico

Discusión

presentaban cambios moleculares apoptóticos, confirmando lo que ya se había descrito en otros tejidos con alta capacidad de renovación celular como el epitelio del intestino delgado⁶⁸ y la capa de Henle de los folículos pilosos.²³²

Se ha comprobado que fuerzas mecánicas ejercidas sobre el citoesqueleto pueden ser transferidas al DNA activando el programa de apoptosis no clásica.⁹³ Esto es compatible con lo que se produce en la QCS donde hay un aumento de la fricción durante el parpadeo, entre una superficie corneal escasamente lubricada y un epitelio conjuntival palpebral engrosado y queratinizado.¹⁰⁸

En este estudio el 72% de las células del grupo II han mantenido la forma poligonal, aunque con un tamaño más heterogéneo y en general más pequeño que las células del grupo I. La disminución del tamaño celular observada en la mayoría de las células del grupo II podría quedar explicada por procesos de apoptosis no clásica en la cual las células presentan una morfología similar a las células normales aunque un tamaño celular inferior.

En un 35.5% de las muestras del grupo I (0.59% del recuento celular total del grupo I) y en el 62% de las citologías del grupo II (1.18% del recuento celular total del grupo II) se han visualizado células muy pequeñas y redondeadas con un citoplasma pequeño, más basófilo que las células superficiales corneales adyacentes y un núcleo grande, redondo y central.

La presencia de este tipo celular atípico puede ser compatible con fases terminales de las células de la superficie corneal sometidas a mecanismos de apoptosis clásica o no clásica, con la presencia de células de estratos corneales inferiores o con una contaminación de la muestra con células conjuntivales adyacentes. La presencia de este tipo de células en la superficie de los animales del grupo I, entre láminas de células corneales sanas descarta en gran medida la contaminación conjuntival. El tamaño, la forma y la disposición de este tipo celular presentan gran similitud con las fases terminales de células sometidas a procesos de apoptosis no clásica descritas por Estil⁶² aunque serían necesarios estudios inmunohistoquímicos complementarios para confirmar el origen de este tipo celular.

Una tercera vía de descamación del epitelio corneal descrita por Estil⁶² establece la existencia de células que se desprenden como células muertas. Son estructuras celulares de igual tamaño que las células normales pero carecen de núcleo, y se las ha denominado células fantasmas. Esta tercera vía de descamación es compatible con la presencia de células anucleadas en el 73.3% de las muestras del grupo I (un 0.83 % del recuento celular total de este grupo) en ausencia de ningún otro signo de metaplasia escamosa.

Una característica destacable en las citologías de los animales del grupo II, que no se ha encontrado en el grupo I, ha sido la presencia en el 67.4 % de las muestras de restos de células inflamatorias y mucosidad localizados entre los espacios intercelulares.

El estudio comparativo entre los dos grupos para el resto de los parámetros estudiados de metaplasia escamosa corneal permite observar diferencias muy significativas. En el 8.74% de las células del grupo II se han identificado células anucleadas frente a un 0.83 % del recuento celular total del grupo I, el 0.49% de las células del grupo II han presentado células binucleadas frente al 0.014% de la totalidad de las células del grupo I y el 6% de las células del grupo II han presentado depósitos de melanina intracitoplasmáticos frente al 0.4% del recuento celular total del grupo I. **(Gráfico 6)**

La zona central de la córnea está exenta de melanocitos y de células dendríticas presentadoras de antígeno, que sí se encuentran en la zona periférica.⁵⁸ En cuadros inflamatorios crónicos, como la QCS, se producen depósitos de pigmento en toda la superficie corneal que finalmente pueden causar ceguera.^{107,109} La presencia de melanina en las muestras de los animales del grupo I puede deberse a que las muestras hayan sido tomadas de la zona periférica o bien a la presencia de enfermedades inflamatorias subclínicas de la superficie central de la córnea.

Corroborando lo observado en este estudio, la presencia de células de la superficie ocular con signos de metaplasia escamosa en animales sanos ha sido descrita en diferentes especies en estudios realizados utilizando citología de impresión.

Tardón describió la presencia de células con signos de metaplasia escamosa caracterizados por la presencia de núcleos degradados o picnóticos y citoplasmas queratinizados en el 10% de las células analizadas tanto de la córnea como de la conjuntiva de gatos sanos.²³⁴

Bolzan, en otro estudio llevado a cabo para establecer el patrón citológico conjuntival normal en perros sanos, destacó en sus resultados que en el 33% de las muestras aparecieron células epiteliales queratinizadas, con un citoplasma rosa claro de aspecto granular y con núcleos degenerados o sin núcleos.¹⁹

Estudios realizados por Gren y Doughty de la conjuntiva de personas asintomáticas, con ojos aparentemente sanos, demostraron que era frecuente encontrar células con signos de metaplasia escamosa en determinadas regiones de la muestra.^{51,79}

La presencia de áreas de metaplasia escamosa en la superficie ocular de individuos asintomáticos, y sin ninguna patología asociada, fue interpretada por Doughty como que incluso irritaciones oculares leves podrían significar un estímulo capaz de inducir esos cambios celulares y planteó la cuestión de si la sensibilidad corneal o conjuntival individual debiera de ser considerada en la interpretación y definición del verdadero estatus de estos individuos.⁵¹

La severidad de los signos clínicos en el síndrome de ojo seco no suele asociarse con la intensidad de la percepción de los síntomas¹⁷¹, por lo que la simple observación con lámpara de hendidura no es suficiente para realizar un diagnóstico preciso de esta enfermedad aunque, como se ha comentado previamente, existen una serie de signos clínicos orientativos.

Discusión

A lo largo de los años se han desarrollado múltiples pruebas con el fin de realizar un diagnóstico preciso de la QCS como son, entre otras, la realización de proteinogramas para determinar la concentración de lisozima y lactoferrina de la lágrima, o la determinación de la osmolaridad de la lágrima entre otras. Sin embargo estas pruebas no están disponibles en los centros veterinarios y su uso se limita casi exclusivamente a medicina humana.

La prueba de tinción con fluoresceína sódica ha sido tradicionalmente utilizada como el método de elección para valorar la integridad de la superficie ocular, y en la actualidad es uno de los procedimientos más frecuentemente empleados para el diagnóstico del ojo seco.^{14,248} La tinción de la superficie corneal y conjuntival con fluoresceína se produce siempre que exista una alteración de las uniones intercelulares,⁶³ sin embargo, la interpretación de la prueba se basa en una lectura cualitativa de los resultados, y es por lo tanto subjetiva. Existen además una serie de variables que pueden influir en la lectura de la prueba como son la concentración del colorante, el volumen aplicado, la técnica de instilación, el intervalo entre la instilación y la observación, el empleo de filtros en la observación y la utilización de sistemas de gradación estandarizados.⁷

El tiempo de ruptura lagrimal (TRL) ha sido considerado por muchos como la prueba diagnóstica principal en prácticamente todos los tipos de ojo seco debido a su alta reproducibilidad y baja variabilidad.^{146,181,248 264} Sin embargo algunos autores han criticado esta prueba por su escasa sensibilidad poniendo de manifiesto diversas variables críticas que pueden afectar a la perfecta interpretación de los resultados como son el volumen de fluoresceína instilada, el tiempo transcurrido desde la instilación del colorante hasta el inicio de la prueba, la concentración de la fluoresceína y los diferentes tipos de filtros empleados.^{7,97,207,216,251}

Aunque el TRL está considerado como el método más sensible, la PSL I es la prueba más empleada en medicina veterinaria para diagnosticar el síndrome de ojo seco. Es una prueba atraumática, barata, fácil de realizar y su uso clínico generalizado se ha mantenido durante más de un siglo. Sin embargo, diversos autores han criticado su variable sensibilidad y reproducibilidad para diagnosticar el síndrome de ojo seco.^{34,102,128,157,177} La sensibilidad de la PLS I aumenta cuando la QCS está en estadios avanzados y se acompaña de una menor producción lagrimal, sin embargo tiene una utilidad limitada en los estadios iniciales de la enfermedad cuando los signos clínicos son leves o moderados.¹²⁸

A esto hay que añadir otros factores que pueden afectar a la reproducibilidad de la prueba que han de tenerse en cuenta para una correcta interpretación de la misma como son, la sensibilidad corneal, el sexo, la edad, el peso del animal, si esta esterilizado o no, el grado de nerviosismo al realizar la prueba, la evaporación, la temperatura y la humedad ambiental, el momento del día en realizar la prueba, el uso de medicaciones que aumenten o disminuyan la producción lagrimal, la correcta manipulación del papel por parte del veterinario si la prueba se realiza con los ojos cerrados o abiertos entre otros.^{7,8,9,16,80,86,106,109,210,224,246}

En nuestro estudio se ha establecido una correlación inversamente proporcional entre los valores obtenidos en la PLS I de los animales del grupo II y los signos de metaplasia escamosa de la superficie corneal, es decir, al disminuir los valores de la PLS I existe un incremento de las alteraciones celulares. Estos resultados corroboran los datos obtenidos en estudios realizados en perros con QCS por Balicki⁶ y Bolzan¹⁹, sin embargo, estos resultados difieren con los obtenidos por Rivas²⁰⁴ que no encontró una correlación entre la PLS I y el grado de metaplasia escamosa de las células de la superficie corneal de pacientes con sequedad ocular.

Además se ha encontrado una correlación entre las medidas de la PLS I y la magnitud del área citoplasmática, nuclear y del ratio N:C, de las células superficiales de la córnea, de tal modo que, cuanto menores son los valores obtenidos en la PLS I menores son las medidas celulares correspondientes al núcleo y citoplasma de las células de la superficie corneal y mayor es el ratio N:C.

Para tratar de determinar la sensibilidad de la citología de impresión en el diagnóstico de alteraciones que afecten a la superficie corneal en casos de QCS canina, los animales del grupo II se han distribuido en función de los valores obtenidos en la PLS I en 3 grupos: leve, moderada y severa.

En el estudio de los diferentes parámetros celulares indicativos de metaplasia escamosa de estos tres grupos sólo se han encontrado diferencias significativas en dos parámetros: células anucleadas y núcleos picnóticos.

La existencia de diferencias significativas en el número de células anucleadas entre los animales con QCS leve y moderada, indica que este parámetro puede ser utilizado para evaluar la progresión de la enfermedad sólo en los estadios iniciales del proceso, por el contrario, la presencia de diferencias significativas en el número de núcleos picnóticos entre los animales con QCS leve y QCS grave, y entre los animales con QCS moderada y QCS grave, permite utilizar este parámetro como un indicador de la progresión desde los estadios iniciales de la enfermedad hasta los más avanzados.

Además, la existencia de diferencias muy significativas en el número de núcleos picnóticos entre el grupo de animales con una QCS leve (PLS I 11-14 mm/min) y los animales del grupo I, con una producción lagrimal normal (PLS I ≥ 15 mm/min), refuerza por un lado, la correlación existente entre la PLS I y los procesos de metaplasia escamosa de la superficie corneal de muestras obtenidas por citología de impresión corneal, y por otro, la importancia del estudio de los núcleos picnóticos como un factor diagnóstico precoz a tener en cuenta en animales con signos leves o inespecíficos de QCS.

CONCLUSIONES

1. La citología de impresión corneal en pacientes caninos ha demostrado ser una técnica útil y de fácil realización en la consulta veterinaria. Proporciona de manera constante muestras con gran cantidad de células y bien conservadas permitiendo el estudio morfométrico detallado de las mismas.
2. El procedimiento desarrollado en este estudio facilita la recogida y el manejo de las muestras, optimiza la técnica para su empleo en animales y minimiza cualquier tipo de lesión iatrogénica sobre la superficie ocular en comparación con los procedimientos de citología de impresión corneal convencionales.
3. Las células del epitelio corneal obtenidas por citología de impresión de animales sanos se ha caracterizado por la presencia de láminas de células epiteliales grandes con escasos espacios intercelulares. Las células presentan forma poligonal con un citoplasma grande y ligeramente basófilo, con núcleos pequeños, redondos, con cromatina finamente granular uniformemente distribuida y en posición central. El área celular media fue de $1727.6 \mu\text{m}^2$ (DE 232.5), el área nuclear media $131.3 \mu\text{m}^2$ (DE 14.1) y el ratio N:C 1:13.3 (DE 1.5).
4. Las citologías de impresión de los animales con signos clínicos de QCS se han caracterizado por presentar menor número de células que las de los animales sanos, una distribución celular irregular y espacios intercelulares cada vez mayores, hasta dar la apariencia de células aisladas. La mayoría de las células han mantenido una morfología poligonal, con un núcleo pequeño, redondo y de localización central y un citoplasma abundante y ligeramente basófilo, de bordes irregulares en muchos casos. El área celular media fue de $1262.7 \mu\text{m}^2$ (DE 303.7), el área nuclear media $83.1 \mu\text{m}^2$ (DE 22.4) y el ratio N:C 1/16.8 (DE 3.6).
5. Se han encontrado diferencias muy significativas en el estudio morfométrico celular entre las córneas sanas y las córneas de animales con QCS. Las células corneales de los animales sin patología corneal han presentado un tamaño citoplasmático y nuclear mayor, y un ratio N:C proporcionalmente menor que las de los animales con QCS.
6. En las citologías corneales de los animales con QCS se ha observado un número significativamente superior de células con signos de degeneración celular.
7. La disminución de los valores de la PLS I se han relacionado con un incremento de las alteraciones celulares.
8. Se ha encontrado una correlación entre los valores de la PLS I y la media del área citoplasmática, nuclear y del ratio N:C de las células superficiales de la córnea. Cuanto menor es el valor obtenido en la PLS I, menor es la medida celular correspondiente al núcleo y citoplasma de las células de la superficie corneal y mayor es el ratio N:C.
9. El número de células anucleadas presentes en las muestras de los animales con QCS moderada es significativamente superior que en las muestras de los animales con QCS leve.
10. La disminución de la PLS I se ha relacionado con el aumento del número de núcleos picnóticos, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre los animales con QCS leve y grave y aquellos con QCS moderada y grave.

Conclusiones

11. El número de células con núcleos picnóticos presentes en las muestras de los animales con QCS leve es significativamente superior al de las muestras de los animales sanos. De esta observación podemos concluir que la presencia de núcleos picnóticos es un factor sensible en la detección precoz de QCS en perros y debe tenerse en cuenta en perros con signos leves o inespecíficos de QCS.

RESUMEN

La citología de impresión corneal es una técnica atraumática, simple, rápida y carente de efectos secundarios que permite estudiar las capas celulares más externas de la superficie ocular, posibilitando el diagnóstico de enfermedades de la misma y su monitorización durante y después del tratamiento.

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral han sido normalizar la técnica de obtención y procesamiento de muestras obtenidas por citología de impresión corneal en la especie canina, determinar los parámetros morfológicos y morfométricos fisiológicos de las células epiteliales corneales en perros sanos y establecer las alteraciones celulares corneales en el transcurso de la QCS canina. Además, se ha estudiado la existencia de una correlación entre las alteraciones del epitelio corneal y la producción lagrimal valorada mediante la prueba lagrimal de Schirmer I (PLS I).

En este estudio se han incluido 60 perros de diferentes razas que han sido divididos en dos poblaciones: el grupo I, formado por pacientes sanos, con unos valores en la prueba lagrimal de Schirmer I (PLS I) iguales o superiores a 15 mm/min y el grupo II, formado por pacientes diagnosticados de QCS con unos valores en la PLS I comprendidos entre 0 y 14 mm/min. Los ojos de los animales del grupo II han sido categorizados a su vez en 3 subgrupos, estableciendo la gravedad de la enfermedad en función de los resultados obtenidos en la PLS I como grave, moderada o leve.

Para facilitar la recogida y el manejo de las muestras, adecuar la técnica para su empleo en animales y disminuir al mínimo cualquier tipo de lesión iatrogénica sobre la superficie ocular se ha utilizado un dispositivo simple y eficaz, diferente a los que se han venido empleando tradicionalmente en oftalmología humana y veterinaria.

La valoración morfométrica de las células se ha realizado atendiendo a los criterios de celularidad de la muestra, separación intercelular, morfología de las células, tinción citoplasmática, área celular, área nuclear, ratio núcleo/citoplasma (ratio N:C) y alteraciones nucleares.

Las citologías corneales del grupo I se han caracterizado por la presencia de láminas de células poligonales, grandes, homogéneas y compactas, con un citoplasma ligeramente basófilo y un núcleo pequeño, redondo y central, con una cromatina finamente granular y uniformemente distribuida. El área celular media fue 1727.6 μm^2 (DE 232.5), el área nuclear media 131.3 μm^2 (DE 14.1) y el ratio N:C 1:13.3 (DE 1.5).

Las citologías corneales del grupo II se han caracterizado por la presencia de láminas integradas por células epiteliales menos numerosas y más heterogéneas que el grupo I. El 72% de las células estudiadas se han caracterizado por tener forma poligonal con un citoplasma abundante y ligeramente basófilo, y un núcleo pequeño, redondo y de localización central o ligeramente excéntrico. El área celular media ha sido 1262.7 μm^2 (DE 303.7), el área nuclear media 83.1 μm^2 (DE 22.4) y han presentado un ratio N:C de 1:16.8 (DE 3.6).

Resumen

Los resultados estadísticos han evidenciado una diferencia estadísticamente muy significativa ($P < 0.0008$) entre las medidas celulares del grupo I y del grupo II. Las células corneales de los animales del grupo I han presentado un tamaño citoplasmático y nuclear mayor pero un ratio N:C proporcionalmente menor que las del grupo II, las cuales se han caracterizado por ser más pequeñas y con un núcleo considerablemente menor que las del grupo I.

Se ha establecido una correlación positiva moderada y muy significativa ($P < 0.0001$) entre los valores de la PLS I y las medidas citoplasmáticas y nucleares de las células corneales respectivamente, y una correlación negativa moderada y muy significativa ($P < 0.0001$) entre los valores de la PLS I y la medida del ratio N:C.

Ha sido posible establecer una correlación negativa de moderada a alta, con un nivel de significación muy alto ($P < 0.0001$), entre los valores obtenidos en la PLS I de todos los individuos y la presencia de alteraciones celulares corneales en las muestras estudiadas.

Se han encontrado diferencias muy significativas en el número de núcleos picnóticos entre los animales con un grado de QCS leve y aquellos con QCS severa, y entre los animales con QCS moderada y QCS severa. Igualmente, han existido diferencias significativas en el número de células anucleadas entre los animales con QCS leve y moderada.

No se han encontrado diferencias en el número de células anucleadas entre el grupo con QCS leve y el grupo de animales con producción lagrimal normal, pero sí se han establecido diferencias muy significativas ($P < 0.0001$) en el número de núcleos picnóticos.

Por tanto, podemos concluir que la citología de impresión corneal es una técnica de fácil realización que permite valorar de forma detallada las células del epitelio corneal tanto en animales sanos como en animales con QCS, demostrando su utilidad en el diagnóstico y caracterización de dicha enfermedad.

SUMMARY

Corneal impression cytology is an atraumatic, simple, fast, lacking side effects technique that allows to study the outermost cell layers of the ocular surface, enabling the diagnosis of diseases and the monitoring during and after treatment.

This Doctoral Thesis has sought to standardize the technique of obtaining and processing samples by corneal impression cytology on the canine species, determine the morphological and morphometric physiological parameters of corneal epithelial cells in healthy dogs and set corneal cellular alterations during canine KCS. The correlation between corneal epithelium alterations and lacrimal production, assessed using Schirmer tear test I (STT I), has also been studied.

This study included 60 dogs of different breeds that were divided into two populations: group I, formed by healthy patients, with Schirmer tear test I (STT I) values equal or greater than 15 mm/min, and group II, which included patients diagnosed with KCS, with STT I values between 0 and 14 mm/min. The eyes of the animals in group II were categorized in turn into 3 subgroups, establishing the severity of the disease based on the results of the STT I as severe, moderate or mild.

In order to ease the collection and handling of samples, adapt the technique for use in animals and minimize any iatrogenic injury on the ocular surface, a simple and effective device was used, other than those that have traditionally been used in human and veterinary ophthalmology.

The morphometric evaluation of the cells was performed according to the criteria of cellularity of the sample, intercellular separation, cell morphology, cytoplasmic staining, cell area, nuclear area, N:C ratio and nuclear alterations.

Corneal cytologies of group I were characterized by the presence of sheets of polygonal, large, homogeneous and compact cells, with a slightly basophilic cytoplasm and small round nucleus, with finely granular and evenly distributed chromatin. The average cell area was 1727.6 μm^2 (SD 232.5), mean nuclear area 131.3 μm^2 (SD 14.1) and the N: C ratio 1:13.3 (SD 1.5).

Corneal cytologies of group II were characterized by the presence of epithelial cell sheets with fewer and more heterogeneous cells compared to group I. 72% of the cells studied were polygonal with abundant cytoplasm and slightly basophilic, and a small, round and centrally located or slightly eccentric core. The average cell area was 1262.7 (SD 303.7) μm^2 , the nuclear area average 83.1 (SD 22.4) μm^2 and the N: C ratio 1:16.8 (SD 3.6).

The statistical results have shown a statistically significant difference ($P < 0.0008$) between cell measures of group I and group II. Corneal cells of animals in group I presented a bigger cytoplasmic and nuclear size but a proportionately smaller N:C ratio than those in group II, which were characterized being smaller and having a considerably smaller nucleus.

A moderate and a highly significant positive correlation ($P < 0.0001$) was established between the STT I values and cytoplasmic and nuclear measurements of the corneal cells respectively, and a moderate negative but highly significant correlation ($P < 0.0001$) between STT I values and N:C ratio measures.

Summary

It has been possible to establish a moderate to high negative correlation, with very high significance ($P < 0.0001$), between STT I values of all individuals and the presence of corneal cellular alterations in the samples studied.

Highly significant differences have been evidenced in the number of pyknotic nuclei between animals with a mild degree of KCS and those with severe KCS and between animals with moderate and severe KCS. Significant differences were also found in the number of enucleated cells between animals with mild and moderate KCS.

No significant differences were found in the number of enucleated cells between the group of animals with mild KCS and the group with normal tear production, though very high significant differences ($P < 0.0001$) have been established in the number of pyknotic nuclei between both groups.

Therefore, we can conclude that corneal impression cytology is an easy technique which allows detailed evaluation of corneal epithelial cells in both healthy animals and those with KCS, demonstrating its utility in the diagnosis and characterization of this ocular disease.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, G.G., Dilly, P.N., Kirkness, C.M. 1988. Monitoring ocular disease by impression cytology. *Eye (Lond)* 2 (Pt 5): 506–516.
2. Adar, S., Kanpolat, A., Sürücü, S., Ucakhan, O.O. 1997. Conjunctival impression cytology in patients wearing contact lenses. *Cornea*. 16: 289-94.
3. Aguirre, G.D., Rubin, L.F., Harvey, C.E. 1971. Keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* May 1; 158 (9):1566-79.
4. Aragona, P., Romeo, G., Puzzolo, D. et al. 1996. Impression cytology of the conjunctival epithelium in patients with vernal conjunctivitis. *Eye* 10: 82–5.
5. Aragona, P., Ferreri, G., Micali, A. et al. 1998. Morphological changes of the conjunctival epithelium in contact lens wearers evaluated by impression cytology. *Eye*. 12: 461-466.
6. Balicki, I., Radziejewski, K., Bielecki, W. 2011. Evaluation of corneal and conjunctival epithelium with the use of impression cytology in mixed-breed dogs diagnosed with keratoconjunctivitis sicca. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 55: 493-499.
7. Barabino, S., Chen, W., Dana, M.R. 2004. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. *Exp. Eye. Res.* Nov. 79 (5): 613-21. Review.
8. Barnett, K.C., Sansom, J. 1985. Dry eye in the dog and its treatment. *Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom* 104: 462–466.
9. Barnett, K.C. 1988. Keratoconjunctivitis sicca: sex incidence. *Journal of Small Animal Practice*. 29: 531–534.
10. Baudouin, C., Haouat, N., Brignole, F., Bayle, J., Gastaud, P. 1992. Immunopathological findings in conjunctival cells using immunofluorescence staining of impression cytology specimens. *Br. J. Ophthalmol. Sep*; 76 (9): 545-9.
11. Baudouin, C., Brignole, F., Becquet, F., et al. 1997. Flow cytometry in impression cytology specimens. A new method for evaluation of conjunctival inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38:1458–1464.
12. Baudouin, C. 2001. The pathology of dry eye. *Surv. Ophthalmol.* 45 (Suppl 2): S211-220.
13. Bauer, G.A, Spiess, B.M., Lutz, H. 1996. Exfoliative cytology of conjunctiva and cornea in domestic animals: A comparison of four collecting techniques. *Veterinary and comparative ophthalmology*. Vol 6. N° 3: 181-186.
14. Behrens, A., Doyle, J.J., Stern, L., Chuck, R.S., et al. 2006. Dysfunctional tear syndrome study group. Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea*. Sep; 25 (8): 900-907.

Bibliografia

15. Berdoulay, A., English, R.V, Nadelstein, B. 2005. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Ophthalmol.* 8, 4 :225-232.
16. Berger, S.L., King, V.L. 1998. The fluctuation of tear production in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association.* 34: 79–83.
17. Blades, K., Doughty, M.J., Patel, S. 1998. Pilot study of the use of impression cytology specimens for qualitative assessment of the surface area of bulbar conjunctival cells. *Optom. Vis. Sci.* 12: 41-45.
18. Blades, K.J., Doughty, M.J. 2000. Comparison of grading schemes to quantitative assessments of nucleus-to-cytoplasmic ratios for human bulbar conjunctival cells collected by impression cytology. *Curr. Eye Res.* Apr; 20 (4): 335-40.
19. Bolzan, A., Brunelli, A., Castro, M., Souza, M., Souza, J.L., Laus, J.L. 2005. Conjunctival impression cytology in dogs. *Veterinary Ophthalmology.* 8, 6: 401-405.
20. Bounous, D.I., Carmichael, P.K., Kaswan, R.L., Hirsch, S., Stiles, J. 1995. Effects of ophthalmic cyclosporine on lacrimal gland pathology and function in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Comp. Ophthalmol.* 5: 5-12.
21. Bounous, D.I., Krenzer, K.L., Kaswan, R.L., Hirsh, S.G. 1998. Conjunctival Impression Cytology from Dogs with Keratoconjunctivitis Sicca. *Lacrimal Gland, Tear Film and Dry Eye Syndromes 2. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Volume 438: 997-1000.
22. Bourcier, T., De Saint-Jean, M., Brignole, F., Goguel, A., Baudouin, C. 2000. Expression of CD40 and CD40 ligand in the human conjunctival epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 120–126.
23. Brandão, C.V.S., Minto, B.W., Rocha, N.S., Ranzani, J.J.T. 2002. Citologia conjuntival por impressão em gatos (*Felis domestica*). *Revta. Educ. Cont. CRMV-SP* 5: 41-47.
24. Brandt, J.D., Wittpenn, J.R. Jr., Katz, L.J., et al.1989. Conjunctival impression cytology in glaucoma patients on chronic topical therapy. *ARVO Abstr. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30 (suppl): 25.
25. Brignole, F., Pisella, J-P., Goldschild, M., et al. 2000. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells in patients with dry eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:1356–1363.
26. Brown, M.H., Galland, J.C., Davidson, H.J., Brighthman, A.H. 1996. The phenol red thread tear test in dogs. *Vet. Comp. Ophthalmol.* 6: 274-277.
27. Cafaro, T.A., Ortiz, S.G., Maldonado, C., Espósito, F.A., Croxatto, J.O., Berra, A., Ale, O.L., Torrealday, J.I., Urrets-Zavalía, E.A., Urrets-Zavalía, J.A., Serra, H.M. 2009. The cornea of Guinea pig: structural and functional studies. *Vet. Ophthalmol.* Jul-Aug;12 (4): 234-41.

28. Calmettes, L. 1956. Etude histologique et histoquimique de l'épithélium antérieur de la cornée et de ses basales. *Arh. Phthamol.* 16: 481-506.
29. Calonge, M., Corrales, R.M., Sáez, V., Mayo, A., Herreras, J.M., Stern, M.E., Chaves, F.J. 2003. Alteration of conjunctival mucin gene expression in tear deficient dry eye syndrome. *IOVS* 2003; 44: ARVO EAbstract 2508.
30. Calonge, M., Diebold, Y., Sáez, V., Enríquez de Salamanca, A., García-Vázquez, C., Corrales, R.M., Herreras, J.M. 2004. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp. Eye Res.* 78: 457–472.
31. Carter, R., Colitz, C.M.H. 2002. The causes, diagnosis and treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Med. Sept.* 97 (9); Proquest 683.
32. Chen, J.J., Tseng, S.C. 1991. Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32: 2219-33.
33. Chen, C.C., Chang, J.H., Lee JB., Javier J., Azar, D.T. 2002. Human corneal epithelial cell viability and morphology after dilute alcohol exposure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43 (8): 2593-2602.
34. Chiang, B., Asbell, P.A., Franklin, B. 1983. Phenol-red tear test and Schirmer test for tear production in normal and dry eye patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (ARVO Suppl). 29: 337.
35. Corrales, R.M., Calonge, M., Herreras, J.M. et al. 2003. Human epithelium from conjunctival impression cytology expresses MUC7 mucin gene. *Cornea.* 22: 665–71.
36. Cotsarelis, G.C.S., Dong, G., Sun, T.T., Lavker, R.M. 1989. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell.* 57: 201-209
37. Creech, J.L., Do, L.T., Fatt, I., Radke, C.J., 1998. In vivo tear-film thickness determination and implications for tear-film stability. *Curr. Eye Res.* 17: 1058–1066.
38. Dana, M.R., Zhu, S.N., Yamada, J. 1998. Topical modulation of interleukin- activity in corneal neovascularization. *Cornea* 17: 403–409.
39. Dart, J. 1997. Impression cytology of the ocular surface--research tool or routine clinical investigation. *Br. J. Ophthalmol.* 81: 930.
40. Davanger, M., Evensen, A. 1971. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature.* 229: 560-561.
41. De Nadai, J., Degaspere, V.L., Pereira, J.A., De Freitas, D., Lima, A.L. 2001. La citología de impresión de la superficie ocular: estudio y técnica de tinción. *Arq. Bras. Oftalmol.* Vol. 64 N° 2. Sao Paulo. Abril-Marzo.
42. Definition and Classification of Dry Eye. 2007. Report of the Diagnosis and Classification Subcommittee of the Dry Eye Work Shop (DEWS). *Ocul. Surf.* 5: 75-92.

Bibliografia

43. Dellmann's Textbook of Veterinary Histology. 2006. Editors: Eurell, J. A., Frappier, B. L. 6th Edition. Wiley-Blackwell.
44. Delmonte, D. 2011. Anatomy and physiology of the cornea. *J. Cataract Refract. Surg.* 37: 588-598.
45. Divani, S.N., Margari, C., Zikos, G.A., Zikos, A., Papavassiliou, G.B. 1997. Diagnostic impression cytology: a simple technique for the diagnosis of external eye disease. *Cytopathology*. Dec; 8 (6): 373-80.
46. Donisi, P.M., Rama, P., Fasolo, A., Ponzin, D. 2003. Analysis of limbal stem cell deficiency by corneal impression cytology. *Cornea*. 22: 533–538.
47. Doughty, M.J. 1990. Morphometric analysis of the surface cells of rabbit corneal epithelium by scanning electron microscopy. *Am. J. Anat.* Dec. 189 (4): 316-28.
48. Doughty, M.J. 1990. On the evaluation of the corneal epithelial surface by scanning electron microscopy. *Optom. Vis. Sci.* Oct; 67 (10): 735-56.
49. Doughty, M.J. 1990. Analyses of areas and shapes of cells on the corneal surface of the albino rabbit by scanning electron microscopy. *Curr. Eye Res.* Apr; 9 (4): 295-306.
50. Doughty, M.J. 1991. Scanning electron microscopy study of cell dimensions of the rabbit corneal epithelium surface. *Am. J. Anat.* 10 (2): 149-155.
51. Doughty, M.J., Blades, K., Button, N.F., Wilson, G. 2000. Further analysis of the size and shape of cells obtained by impression cytology from the exposed portion of the human bulbar conjunctiva. *Ophthalmic Physiol. Opt.* Sep; 20 (5): 391-400.
52. Doughty, M.J. 2004. Further assessment of the size, shape and surface features of superficial cells of the bovine corneal epithelium, using scanning electron microscopy. *Curr. Eye Res.* Mar; 28 (3): 203-14.
53. Doughty, M.J. 2008. Normal features of superficial non desquamating cells of the rabbit corneal epithelium assessed by scanning electron microscopy. *Vet. Ophthalmol.* Mar-Apr; 11 (2): 81-90.
54. Dua, H.S., Forrester, J.V. 1990. The corneoescleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am. J. Ophthalmol.* 110 (6): 646-656.
55. Dua, H.S., Azuara-Blanco, A. 2000. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv. Ophthalmol.* 44 (5): 415-425.
56. Duane, T.D., Jaeger, E.A. 1982. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology: vol I: anatomy, embryology, and teratology.* Tasman, W. and Jaeger, E.A. editors. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia.

57. Duane, T.D., Jaeger, E.A. 1990. Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology: Vol. I: anatomy, embryology and teratology. Tasman, W. and Jaeger, E.A. editors. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia.
58. Durán de la Colina, J.A. 1998. Anatomofisiología de la córnea. In: Juan A. Durán de la Colina. Complicaciones de las lentes de Contacto. LXXIV ponencia oficial de la Sociedad Española de Oftalmología. Madrid. Tecimedia editorial, S.L. pp. 13-27.
59. Dursun, D., Bozbeyoglu, S., Karabay, G., Akova, Y.A. 2007. Evaluation of ocular surface changes in a rabbit dry eye model using a modified impression cytology technique. *Curr. Eye Res.* Apr. 32 (4): 301-7
60. Egbert, P.R., Lauber, S., Maurice, D.M. 1977. A simple conjunctival biopsy. *Am. J. Ophthalmol.* 84: 798-801.
61. Ehlers, N. 1970. Some comparative studies on the mammalian corneal epithelium. *Acta Ophthalmol. (Copenh).* 48 (4): 821-8.
62. Estil, S., Primo, E.J., Wilson, G. 2000. Apoptosis in shed human corneal cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (11): 3360-3364.
63. Feenstra, R.P., Tseng, S.C. 1992. Comparison of fluorescein and rose bengal staining. *Ophthalmology.* Apr; 99 (4): 605-17.
64. Fernández, A., Moreno, J., Prósper, F., García, M., Echeveste, J. 2008. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *An. Sist. Sanit. Navar.* 31 (1): 53-69.
65. Fini, M. E., Stramer, B. M. 2005. How the cornea heals: cornea specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*, 24 (8 Suppl 1), S2-S11.
66. Fogle, J.A., Yoza, B.K., Neufeld, A.H. 1980. Diurnal rhythm of mitosis in rabbit corneal epithelium. *Albrecht V: Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 213,143.
67. Gao, J., Scwalb, T.A, Addeo, J.V. et al. 1998. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical cyclosporine A therapy. *Cornea.* 17: 654-663.
68. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* Nov; 119 (3): 493-501.
69. Gellat, K.N. et al. 1975. Evaluation of tear formation in the dog, using modification of the Schirmer tear test. *JAVMA* 166 (4): 368-370.
70. Gilbard, J.P. 1978. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch. Ophthalmol.* 96 (4): 677-681.

Bibliografia

71. Gilbard, J.P., Carter, J.B., Sang, D.N., Refojo, M.F., Hanninen, L.A., Kenyon, K.R. 1984. Morphologic effect of hyperosmolarity on rabbit corneal epithelium. *Ophthalmology*. Oct; 91 (10): 1205-12.
72. Gilger, B.C., Whitley, R.D., McLaughlin, S.A., Wright, J.C., Drane, J.W. 1991. Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *Am. J. Vet. Res.* Oct; 52 (10): 1570-2.
73. Gilger, B.C., Andrews, J., Wilkie, D.A., Wyman, M., Lairmore, M.D. 1995 .Cellular immunity in dogs with keratoconjunctivitis sicca before and after treatment with topical 2% cyclosporine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49: 199-208.
74. Gilger, B.C. 2007. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. *Veterinary Ophthalmology*. Kirk N. Gellat, editor. Blackwell Publishing. Fourth Edition. Volume 2. Chapter 15: 690-752.
75. Gipson, I.K., Watanabe, H., Zieske, J. 1993. Corneal wound healing and fibronectina. A review. *Int. Ophthalmol. Clin.* 33 (4): 149-163.
76. Gipson, I.K. 1994. Anatomy of the conjunctiva, cornea and limbus. In *The Cornea* (Ed. G. Smolin, R.A. Thoft) 3rd ed. Little Brown, Boston. pp 3-24.
77. Giuliano, E.A., Moore, C.P. 2007. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. *Veterinary Ophthalmology*. Kirk N. Gellat, editor. Blackwell Publishing. Fourth Edition. Volume 2. Chapter 13: 633-661.
78. Glenwood, G.G., Gellat, K.N., Esson, D.W. 2007. Physiology of the eye. *Veterinary Ophthalmology*. Kirk N. Gellat, editor. Blackwell Publishing. Fourth Edition. Volume 1. Chapter 3: 149-182.
79. Grene, R.B., Lankston, P. 1990. Cartography of impression cytology. *Cornea*. Oct; 9 (4) : 275-8.
80. Gupta, A., Heigle, T., Pflugfelder, S.C. 1997. Nasolacrimal stimulation of aqueous tear production. *Cornea* 16: 645–648.
81. Haller-Schober, E.M., Schwantzer, G., Berghold, A., Fischl, M., Theisl, A., Horwath-Winter, J. 2006. Evaluating an impression cytology grading system (IC score) in patients with dry eye syndrome. *Eye (Lond)*. Aug. 20 (8): 927-33.
82. Hamano, H.M., Hori, M., Hamano, T. et al. 1983. A new method for measuring tears. *CLAO J*, 9: 281–9.
83. Hamor, R.E., Roberts, S.M., Severin, G.A et al. 2000. Evaluation of results for Schirmer tear tests conducted with and without application of a topical anesthetic in clinically normal dogs of 5 breeds. *American Journal of Veterinary Research* 61 (11): 1422–1425.
84. Hareuveni, T., Maurice, D.M. Short-term reproducibility of impression cytology. *Cornea*. 1994 May; 13 (3): 250-2.

85. Hart, R.W., Farrell, R.A. 1969. Light scattering in the cornea. *J. Opt. Soc. Am.* 59: 766–774.
86. Hartley, C., Williams, D.L., Adams, V.J. 2006. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*. 9 (1): 53–57.
87. Helper, L.C. 1976. Keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Trans. Sect. Ophthalmol. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 81: 624–8.
88. Hibino, S.H., Watanabe, H. 2002. Mucins and ocular surface disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 506: 275–281.
89. Hogan, M. J., Alvarado, J.A., Weddell, E. 1971. *Histology of the Human Eye*. Philadelphia, WB Saunders.
90. Hu, Y., Purushotham, K.R., Wang, P., Dawson Jr., R., Humphreys-Beher, M.G., 1994. Downregulation of beta-adrenergic receptors and signal transduction response in salivary glands of NOD mice. *Am. J. Physiol.* 266: G433–G443.
91. Huang, A.J, Tseng, S.C.1991. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32: 96-105.
92. Hughes, A.P., Shaw, N.J., Southall, P., Hero, M., Bowden, L., Young, R.H. et al. 1997. Conjunctival impression cytology in the preterm infant and it's relation to outcome. *J. Pediatr.* 156: 471-5.
93. Ingber, D.E., Dike, L., Hansen, L., Karp, S., Liley, H., Maniotis, A., McNamee, H., Mooney, D., Plopper, G., Sims, J., et al. 1994. Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 150: 173-224
94. Jakus, M.A. The fine structure of the human cornea. 1961. In: Smelser, G.K., editor. VII International Congress of Anatomists. New York: Academic Press. 343-66
95. Jegou, J.P., Liolet,S. 1993. The benefit of conjunctival scraping cytology in the biological diagnosis of conjunctivitis in the dog and cat. *European journal of companion animal practice*. V 3: 83-87.
96. Jhonson, M.E., Murphy, P.J. 2004. Changes in tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Progress in Retinal and Eye Research*. 23: 449-474.
97. Johnson, M.E., Murphy, P.J. 2005a. The effect of instilled fluorescein solution volume on the values and repeatability of TBUT measurements. *Cornea*, 24: 811–817.
98. Julio Moran, G. 2006. Estudio de los cambios morfológicos del epitelio corneal en un modelo animal de ojo seco. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. Departament d'Anatomia i Embriologia Humana.

Bibliografia

99. Jones, D.T., Monroy, D., Ji, Z., Atherton, S.S., Pflugfelder, S.C. 1994. Sjögren's syndrome: cytokine and Epstein-Barr viral gene expression within the conjunctival epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 3493–3504
100. Jones, S.M. 1997. Quantification of conjunctival sac bacteria in normal dogs and those suffering from keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Comp. Ophthalmol.* 7 (1): 29-35.
101. Kafarnik, C., Fritsche, J., Reese, S. 2007. In vivo microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Vet. Opht.* 10 (4): 222-230.
102. Kallarackal, G.U., Ansari, E.A., Amos, N., Martin, J.C., Lane, C., Camilleri, J.P. 2002. A comparative study to assess the clinical use of Fluorescein Meniscus Time (FMT) with tear break up time (TBUT) and Schirmer's tests (ST) in the diagnosis of dry eyes. *Eye.* 16: 594–600.
103. Kantelip, B. Anatomie de l'épithélium cornéen. In: Rigal, D. L'épithélium cornéen; Paris: Masson; 1993: 8-23.
104. Kaswan, R.L., Martin, C.L., Chapman W.L. Jr. 1984. Keratoconjunctivitis sicca: Histopathologic study of nictitating membrane and lacrimal glands from 28 dogs. *Am. J. Vet. Res.* 45: 112-118.
105. Kaswan, R.L. 1985. Keratoconjunctivitis sicca: Immunological evaluation of 62 canine cases. *AJVR* 46 (2): 376-383.
106. Kaswan, R.L., Salisbury, M.A., Ward, D.A. 1989. Spontaneous canine keratoconjunctivitis sicca. A useful model for human keratoconjunctivitis sicca: treatment with cyclosporine eye drops. 107: 1210-1216.
107. Kaswan, R.L., Salisbury, M.A. 1990. A new perspective on canine keratoconjunctivitis sicca. Treatment with ophthalmic cyclosporine. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 20: 583-613.
108. Kaswan, R.L., Salisbury, M.A. 1993. Canine keratoconjunctivitis sicca: Etiology, clinical signs, diagnosis and treatment. Part II. Diagnosis and treatment with cyclosporine. *J. vet. Allergy Clin. Immunol.* 2 (1): 8-12.
109. Kaswan, R.L. 1995. Diagnosis and management of keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Med.* 90 (6). 539-560.
110. Kaswan, R., Pappas, C. Jr., Wall, K. et al. 1998. Survey of canine tear deficiency in veterinary practice. *Ad. Exp. Med. Biol.* 438: 931-939.
111. Kawasaki, S., Kawamoto, S., Yokoi, N., Connon, C., Minesaki, Y., Kinoshita, S., Okubo, K. 2003. Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjögren's syndrome. *Exp. Eye Res.* 77: 17-26.
112. Kern, T.J., Erb, H.N., Schaedler, J.M., Dougherty, E.P. 1988. Scanning electron microscopy of experimental keratoconjunctivitis sicca in dogs: corneal and bulbar conjunctiva. *Vet. Pathol.* 25: 468-74.

113. Khono, T., Sorgente, N., Ishibashi, T., Goodnight, R., Ryan, S.J. 1987. Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Mar; 28 (3): 506-14.
114. Kim, J., Foulks, G.N. 1999. Evaluation of the effect of lisamine green and rose bengal on human corneal epithelial cells. *Cornea*.18: 328-32.
115. Klyce, S.D., Beuerman, R.W. 1987. Structure and function of the cornea. In: Kaufman, H.E., Barron, B.A., McDonald, M.B., Waltman, S.R., editors. *The cornea*. 1-47.
116. Kruse, F.E., Jaeger, W., Gotz, M.L., Schmitz, W. 1986. Conjunctival morphology in Sjögren's syndrome and other disorders of the anterior eye. A light and electron microscopic study based on impression cytology. *Scand. J. Reumatol., Suppl.* 61: 206-214.
117. Kruse, F.E., Chen, J.J.Y., Tsai, R.J.F., Teng, S.C.G. 1990. Conjunctival transdifferentiation is due to incomplete removal of limbal basal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31 (9): 1903-1913.
118. Kruse, F.E. 1994. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye (Lond)*. 8 (Pt 2): 170-83.
119. Kunert, K.S., Tisdale, A.S., Stern, M.E. 1999. Effect of cyclosporine ophthalmic emulsion on the number of inflammatory cells and goblet cells in conjunctival biopsies with dry eye (abstract). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40 (Suppl): S771.
120. Larmande, A., Timsit, E. 1954. L'inté'ret de cyto-diagnostiques en ophtalmologie: communication préliminaire á propos d neuf cas de tumeurs du limbe scléro-cornéen. *Bull. Soc. Ophthalmol. Fr.* 19: 415-419.
121. Lavker, R.M., Dong, G., Cheng, S.Z., Kudoh, K., Cotsarelis, G., Sun, T.T. 1991. Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* May; 32 (6): 1864-75.
122. Lavker, R.M., Tseng, S.C., Sun, T.T. 2004. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp. Eye Res.* 78: 433-446.
123. Ledbetter, E.C., Scarlett, J.M. 2009. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. *Vet. Ophthalmol.* Nov-Dec; 12 Suppl. 1: 57-64.
124. Lee, S.H., Tseng, S.C. 1997. Rose bengal staining and cytologic characteristics associated with lipid tear deficiency. *Am. J. Ophthalmol.* 124: 736-750.
125. Lemp, M.A., Hamill, J.R. 1973. Factors affecting tear film breakup in normal eyes. *Arch. Ophthalmol.* 89: 103-105.

Bibliografía

126. Lemp, M.A, Gold, J.B. 1986. The effects of extended-wear hydrophilic contact lenses on the human corneal epithelium. *Am. J. Ophthalmol.* Mar. 15; 101 (3):274-7.
127. Lemp, M.A., Gold, J.B. 1985. An in vivo Study of the corneal surface in Keratoconjunctivitis Sicca. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* 104, 436.
128. Lemp, M.A. 2008. Advances in understanding and managing Dry Eye Disease. *Am. J. Ophthalmol.* 146: 350 –356.
129. Levenson, J.E. 1973. The effect of short-term drying on the surface ultrastructure of the rabbit cornea: a scanning electron microscopic study. *Ann. Ophthalmol.* Aug; 5 (8): 865-77.
130. Li, J., Ha, Y.M., Ku, N.Y., Choi, S.Y., Lee, S.J., Oh, S.B., Kim, J.S., Lee, J.H., Lee, E.B., Song, Y.W., Park, K., 2004. Inhibitory effects of autoantibodies on the muscarinic receptors in Sjögren's syndrome. *Lab. Invest.* 84: 1430-1438.
131. Liu, C.Y., Zhu, G., Converse, R., Kao, C.W., Nakamura, H., Tseng, S.C. et al. 1994. Characterization and chromosomal localization of the cornea-specific murine keratin gene Krt1.12. *J. Biol. Chem.* 269: 24627-24636.
132. López-García, J.S., Rivas, L., García-Lozano, I. 2005a. Severe limbal deficiency treated by combined limbal allograft and amniotic membrane transplantation. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 80: 405–412.
133. López García, J.S., Rivas, L., García Lozano, I. 2005b. Valoración del nivel de suficiencia limbal como factor pronóstico en las queratoplastias. *Microcirugía Ocular* Número 1.
134. López-García, J.S., Rivas, L., García-Lozano, I. 2005c. Moderate limbal deficiency in patients with congenital aniridia treated with amniotic membrane transplantation. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 80: 517–523.
135. López-García, J.S., Rivas, L., García-Lozano, I. 2006a. Corneal epithelium squamous metaplasia determination as diagnostic factor in limbal deficiency. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 81: 281–288.
136. López-García, J.S., Rivas, L., García Lozano, I. 2007. Síndrome de insuficiencia limbal. *Publicaciones Thea.* N° 24.
137. Lopin, E., Deveney, T., Asbell, P.A. 2009. Impression cytology: recent advances and applications in dry eye disease. *Ocul. Surf.* 7: 93–110.
138. Luo, L., Reinach, P.S., Ka, W.W. 2001. Corneal epithelial wound healing. *Exp. Biol. Med* (Maywood). Jul; 226 (7): 653-64.
139. Mai, G., Yang, S., 1991. Relationship between corneal dellen and tearfilm breakup time. *Yan Ke Xue Bao* 7: 43–46.

140. Malerba, T.A. 1990. Citologia esfoliativa de conjuntiva de cães (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis domestica*). Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo.
141. Martinez, A.J., Mills, M.B., Jaceldo, K.B., Tio, F.O., Aigbivbalu, I.B., Hilsenbeck, S.B., Yee, R.W. 1995. Standardization of conjunctival impression cytology. *Cornea* 14: 512-22.
142. Maskin, S.L., Bodé, D.D. 1986. Electron microscopy of impression-acquired conjunctival epithelial cells. *Ophthalmology* 93: 1518–23.
143. Maskin, S.L., Heitman, K.F., Lawton, A.W., Yee, R.W. 1989. Diagnostic impression cytology for external eye disease. *Cornea*. 8: 270–3.
144. Maurice, D.M., 1957. The structure and transparency of the corneal stroma. *J. Physiol.* 136: 263–286.
145. Mawas, J. 1957. Innervation of the corneal endothelium of the eye of the rabbit. *Arch. Ophthalmol. Fr.* 58: 246-256.
146. McCulley, J.P., Sciallis, G.F. 1977. Meibomian keratoconjunctivitis. *Am. J. Ophthalmol.* 84: 788-793.
147. McCulley, J.P., Shine, W.E. 1997. A compositional based model for the tear film lipid layer. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 95: 79-88.
148. McGavin, M.D., Zachary, J.F. 2007. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 4th ed. Mosby-Elsevier, St. Louis, Missouri.
149. McKelvie, P. 2003. Ocular surface impression cytology. *Adv. Anat. Pathol. Nov;* 10(6):328-37. Review.
150. McMenamin, P.G., Steele, C., McGhee, C.N.J. 1997. Cornea anatomy, physiology and healing. En *Excimer lasers in Ophthalmology*. Editor Charles McGhee (Martin Dunitz. Londres) pp 41-63.
151. Meek, K.M., Fullwood, N.J. 2001. Corneal and scleral collagens--a microscopist's perspective. *Micron.* Apr. 32 (3): 261-72.
152. Meller, D., Augustin, A.J., Koch, F.H. 1996. A modified technique of impression cytology to study the fine structure of corneal epithelium. *Ophthalmic Res.* 28: 71-9.
153. Miller, P. E., Panciera, D. L. 1994. Effects of experimentally induced hypothyroidism on the eye and ocular adnexa of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 55: 692-697
154. Moore, C.P., Wilsman, N.J., Nordheim, E.V. et al. 1987. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 28: 1925-1932.

Bibliografía

155. Moore, C.P. 1998. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In: Gelatt, K.N. (Ed), *Veterinary Ophthalmology*, third ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, USA, pp 583-607.
156. Moore, J.E., Grahan, J.E., Goodall, E.A. 2009. Concordance between common dry eye diagnostics tests. *Br. J. Ophthalmol.* 93: 66-72.
157. Morales-Fernández, L., Pérez-Álvarez, J., García-Catalán, R., Benítez del Castillo, J.M., García-Sánchez, J. 2010. Correlación clínico-histológica en los pacientes con ojo seco. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 85 (7): 239-245.
158. Morgan, R.V., Abrams, K.L. 1991. Topical administration of cyclosporine for treat of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 1043-6.
159. Muller, L.J., Marfurt, C.F., Kruse, F., Tervo, T.M. 2003. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 76: 521-542.
160. Murube, J., Rivas, L. 2002. Dry eye: clinical impression cytology classification. *Arch. Soc. Canar. Oftal.* N°13.
161. Murube, J., Rivas, L., 2003a. Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur. J. Ophthalmol.* 13: 115-127.
162. Murube, J. 2014 Rose Bengal: the second most commonly used surfocular vital stain. *Ocul. Surf.* (Jan) 12 (1): 14-22.
163. Nakamura, T., Nishida, K., Dota, A., Matsuki, M., Yamanishi, K., Kinoshita, S. 2001. Elevated expression of transglutaminase 1 and keratinization-related proteins in conjunctiva in severe ocular surface disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (3): 549-56.
164. Nakamura, S., Shibuya, M., Saito, Y., Nakashima, H., Saito, F., Higuchi, A., Tsubota, K. 2003. Protective effect of D-beta-hydroxybutyrate on corneal epithelia in dry eye conditions through suppression of apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Nov; 44 (11): 4682-8.
165. Nell, B., Walde, I., Billich, A., Vit, P., Meingassner, J.G. 2005. The effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from a exploratory study. *Vet. Ophthalmol.* 8, 1: 39-46.
166. Nelson, J.D. 1982. Ocular surface impression using a cellulose acetate filter material. *Arch. Ophthalmol.* 27: 67-9
167. Nelson, J.D., Havener, V.R., Cameron, J.D. 1983. Cellulose acetate impressions of the ocular surface. Dry eye states. *Arch. Ophthalmol.* 101: 1869-1872.
168. Nelson, J.D., Wright, J.C. 1984. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch. Ophthalmol.* 102: 1049-1051.

169. Nelson, J.D., 1988. Impression cytology. *Cornea* 7: 71–81.
170. Nelson, J.D. 1994. Diagnosis of keratoconjunctivitis sicca. *Int. Ophthalmol. Clin.* 34: 37–56.
171. Nichols, K.K., Nichols, J.J., Mitchell, G.L. 2004. The lack of association between signs and symptoms in patients with dry eye disease. *Cornea*. 23: 762-70.
172. Nolan, G.R., Hirst, L.W., Bancroft, B.J. 2001. The cytomorphology of ocular surface squamous neoplasia by using impression cytology. *Cancer*. Feb. 25; 93 (1): 60-7.
173. Norn, M.S. 1969b. Desiccation of the precorneal film I. Corneal wetting-time. *Acta Ophthalmol. (Copenh)*, 47:865-80.
174. Norn, M.S. 1969c. Desiccation of the precorneal film II. Permanent discontinuity and Dellen. *Acta Ophthalmol. (Copenh)*, 47: 881-9.
175. Ofri, R., Lambrou, G.N., Allgoewer, I, Graenitz, U., Pena, T.M., Spiess, B.M., Latour, E. 2009. Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: a comparison with cyclosporine A. *Vet. J. Jan*; 179 (1): 70-77.
176. Olivero, D.K., Davidson, M.G., English, R.V. et al. 1991. Clinical evaluation of 1% cyclosporine for topical treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*.199: 1039-1092.
177. Ollivier, F.J., Plummer, C.E., Barrie, K.P. Ophthalmic examination and diagnostics. 2007. *Veterinary Ophthalmology*. Kirk N. Gellat, editor. Blackwell Publishing. Fourth Edition. Volume 1. Chapter 9, 438-476.
178. Orndorff, W.R., Hemmer, A.J. 1927. Fluorescein and some of its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 49: 1272–1280.
179. Oroza, M.A. 2000. Estudio inmunohistoquímico y morfológico en ojos de pacientes con Síndrome de Sjögren. Doctoral Thesis. University Complutense of Madrid. Quoted in: Rivas, L., Murube, J. 2001. Utilización de la citología de impresión en el diagnóstico de las enfermedades de la superficie ocular. *Barcelona: Novartis Ophthalmics*.1-33.
180. Paridaens, A.D., McCartney, A.C., Curling, O.M., Lyons, C.J. Hungerford, J.L. 1992. Impression cytology of conjunctival melanosis and melanoma. *Br. J. Ophthalmol.* 76: 198-201.
181. Paschides, C.A., Kitsios, G., Karakostas, K.X. 1989. Evaluation of tear break-up time, Schirmer's I test and rose Bengal staining as a confirmatory test for keratoconjunctivitis sicca. *Clin. Exp. Rheumatol.* 7: 155-157.
182. Paschides, C.A., Petroutsos, G., Psilas, K. 1991. Correlation of conjunctival impression cytology results with lacrimal function and age. *Acta Ophthalmol. (Copenh)*. Aug; 69 (4): 422-5.

Bibliografía

183. Pastor, S.A., Shuster, A.R., Miller, M.M., Lam, K.W. 1991. Use of impression cytology to demonstrate a retrovirus in AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. *Cornea*. Nov; 10 (6): 511-5.
184. Peirce, V., Harmer, E., Williams, D.L. Prevalence of keratoconjunctivitis in the canine population: Schirmer tear tests in one thousand normal dogs. *Veterinary Journal* submitted.
185. Pepose, J.S. 1988. Application of immunological technology to the diagnosis of viral infections of the ocular surface. *Cornea*. 7: 36-43.
186. Perell, H.F., Koh, S.M., Benner, J.D., Blasini, M. 1989. In vivo and in vitro changes of human conjunctival epithelial cells treated with timolol maleate. *ARVO Abstr. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30 (suppl): 25.
187. Pflugfelder, S.C., Huang, A.J.W., Feuer, W., Chuchovski, P.T., Pereira, I., Tseng, S.C.G. 1990. Conjunctival cytologic features of primary Sjögren's syndrome. *Ophthalmology* 97: 985-991
188. Pflugfelder, S.C, Jones, D., Ji, Z., et al. 1999. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr. Eye Res.* 19: 201-211.
189. Pflugfelder, S.C., Solomon, A., Dursun, D., Li, D.Q. 2002. Dry eye and delayed tear clearance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 506: 739-743.
190. Pisella, P., Brignole, F., Debbasch, C., Lozato, P., Creuzot-Garcher, C., Bara, J., Saiag, P., Warnet, J., Baudouin, C. 2000. Flow cytometric analysis of conjunctival epithelium in ocular rosacea and keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology* 107: 1841-1849.
191. Pizzarello, L.D., Jakobiec, F.A. 1978. Bowen's disease of the conjunctiva, in Jakobiec, F.A. (ed): *Ocular and Adnexal Tumors*, Birmingham, Aexcu lapius, pp 553-71.
192. Potten, C.S., Loeffler, M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. Dec; 110 (4): 1001-20. Review.
193. Puangsricharern, V., Tseng, S.C.G. 1995. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 102: 1476-85.
194. Ratkay-Traub, I., Hopp, B., Bor, Z., Dux, L., Becker, D.L., Krenacs, T. 2001. Regeneration of rabbit cornea following excimer laser photorefractive keratectomy: a study of gap junctions, epithelial junctions and epidermal growth factor receptor expression in correlation with cell proliferation. *Exp. Eye Res.* 73 (3): 291-302.
195. Raviola, E. *Tratado de Histología Bloom Fawcett*. 12ª edición. McGraw-Hill interamericana. 34: 952-953.

196. Reddy, M., Reddy, P.R., Reddy, S.C. 1991. Conjunctival impression cytology in dry eye states. *Indian J. Ophthalmol.* 39: 22–24.
197. Reina, S., Sterin-Borda, L., Orman, B., Borda, E. 2004. Human mAChR antibodies from Sjögren's syndrome sera increase cerebral nitric oxide synthase activity and nitric oxide synthase mRNA level. *Clin. Immunol.* 113: 193–202.
198. Ren, H., Wilson, G. 1996a. The cell shedding rate of the corneal epithelium: a comparison of collection methods. *Curr. Eye Res.* 15 (10): 1054-1059.
199. Ren, H., Wilson, G. 1996b. Apoptosis in the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37 (6): 1017-1025.
200. Ren, H., Wilson, G. 1997. The effect of a shear force on the cell shedding rate of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol. Scand.* Aug; 75 (4): 383-7
201. Resnikoff, S., Luzeau, R., Filliard, G., Amedee-Manesme, O. 1992. Impression Cytology with Transfer in xerophthalmia and conjunctival diseases. *Int. Ophthalmol.* Nov; 16 (6): 445-51.
202. Rigal, D. 1993. Anatomie de l'épithélium cornéen. Le renouvellement de l'épithélium corneén. La barrière épithéliale. Dégénérescences épithéliales. En L'épithélium cornéen. Société Française d'Ophthalmologie. Masson .Paris
203. Rivas, L., Oroza, M.A., Perez-Esteban, A., Murube-del-Castillo, J. 1991. Topographical distribution of ocular surface cells by the use of impression cytology. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 69: 371-376.
204. Rivas, L., Oroza, M.A., Perez-Esteban, A., Murube-del-Castillo, J. 1992. Morphological changes in ocular surface in dry eyes and other disorders by impression cytology. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 230: 329-334.
205. Rivas, L., Murube, J., Shalaby, O., Oroza, M.A., Sanz, A.I. 2002. Impression cytology contribution to differential diagnosis of Sjögren syndrome in the ophthalmological clinic. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* Feb; 77 (2): 63-72.
206. Rivas, L., Murube, J., Rivas, A., Shalaby, O. 2004. The contribution of impression cytology towards the diagnosis of cicatricial ocular pemphigoid in its primary stages. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 79: 67-74.
207. Roberts, D.K. 1991. Keratoconjunctivitis sicca. *J. Am. Optom. Assoc.* 62: 187-199.
208. Rolando, M., Terragna, F., Giordano, G., Calabria, G. 1990. Conjunctival surface damage distribution in keratoconjunctivitis sicca. An impression cytology study. *Ophthalmologica;* 200 (4): 170-6.
209. Romanchuk, K.G. 1982. Fluorescein physiochemical factors affecting its fluorescence. *Surv. Ophthalmol.* 26: 269-283.

Bibliografía

210. Saito, A., Izumisawa, Y., Yamashita, K., Kotani, T. 2001. The effect of the third eyelid gland removal on the ocular surface of dogs. *Vet. Ophthalmol.* 4: 13-18.
211. Saito, A., Kotani, T. 2001. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. *Vet. Ophthalmol.* Mar; 4 (1): 7-11. Erratum in: *Vet. Ophthalmol.* Sep; 4 (3): 231.
212. Salisbury, M.A., Kaswan, R.L., Ward, D.A. et al. 1990. Topical application of cyclosporine in the management of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association.* 26: 269-274.
213. Samuelson, D.A. 2007. *Ophthalmic Anatomy. Veterinary Ophthalmology.* Kirk N. Gellat, editor. Blackwell Publishing. Fourth Edition. Volume1. Chapter 2: 39-148.
214. Sanchez, R.F., Innocent, G., Mould, J., Billson, F.M. 2007. Canine keratoconjunctivitis sicca: disease trends in a review of 229 cases. *J. Small Anim. Pract.* Apr; 48 (4): 211-7.
215. Sansom, J., Barnett, K.C. 1985. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: A review of two hundred cases. *J. Small. Anim. Pract.* 26: 121-131.
216. Savini, G., Prabhawasat, P., Kojima, T., Grueterich, M., Espana, E., Goto, E. 2008. The challenge of dry eye diagnosis. *Clin. Ophthalmol.* Mar; 2 (1): 31-55.
217. Sawada, Y., Yuan, C., Huang, A.J. 2004. Impression cytology in the diagnosis of acanthamoeba keratitis with surface involvement. *Am. J. Ophthalmol.* 137: 328-8.
218. Schafer, M., Carter, L., Stein, C. 1994. Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4219-4223.
219. Schermer, A., Galvin, S., Sun, T. 1986. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggest limbal location of corneal epithelial stem cells. *J. Cell Biol.* 103: 49-62.
220. Scott, J.E. 1991. Proteoglycan: collagen interactions and corneal ultrastructure. *Biochem. Soc. Trans.* Nov; 19 (4): 877-81.
221. Shively, J.N., Epling, G.P. 1970. Fine structure of the canine eye: Cornea. *Am. J. Vet. Res.* 31 (4): 713-722.
222. Singh, R., Joseph, A., Umopathy, T., Tint, N.L., Dua, H.S. 2005. Impression cytology of the ocular surface. *Br. J. Ophthalmol.* Dec; 89 (12): 1655-9. Review.
223. Slatter, D. 2004. *Fundamentos de oftalmología veterinaria.* 3 ed. Buenos Aires: Inter-Médica. Cap. 11: Córnea y esclerótica. p. 290-349.
224. Smith, E.M., Buyukmihci, N.C., Farver, T.B. 1995. Effect of topical pilocarpine treatment on tear production in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 205: 287-289.

225. Smolek, M.K., Klyce, S.D. 1993. Cornea. In: Wasman W, Jaeger EA, eds. Biomedical Foundations of Ophthalmology. Vol 1 Philadelphia: JB Lippincott. 1-20.
226. Solomon, A., Dilek, D., Liu, Z., Xie, Y., Macri, A., Pflugfelder, S.C. 2001. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42: 2283-2292.
227. Spiess, B. 2004. Conditions of the cornea. ESAVS training programme Ophthalmology 1. Section 7.
228. Sridhar, M.S., Vemuganti, G.K., Bansal, A.K., Rao, G.N. 2001. Impression cytology-proven corneal stem cell deficiency in patients after surgeries involving the limbus. Cornea. Mar; 20 (2): 145-8.
229. Stern, M.E., Beuerman, R.W., Pflugfelder, S.C. 2004. Dry eye and ocular surface disorders. Chapter 3: The normal tear film and ocular surface. Ed. Taylor and Francis.
230. Stern, M.E., Gao, J., Siemasko, K.F., Beuerman, R.W., Pflugfelder, S.C. 2004. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. Exp. Eye Res. Mar; 78 (3): 409-16. Review.
231. Stevenson, D., Tauber, J., Reis, B.L. 2000. The cyclosporine A Phase 2 Study Group. Efficacy and safety of cyclosporine A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. Ophthalmology.107: 967—74.
232. Tamada, Y., Takama, H., Kitamura, T., Yokochi, K., Nitta, Y., Ikeya, T., Matsumoto, Y. 1994. Identification of programmed cell death in normal human skin tissues by using specific labelling of fragmented DNA. Br. J. Dermatol. Oct; 131 (4): 521-4.
233. Tananuvat, N., Lertprasertsuk, N., Mahanupap, P., Noppanakeepong, P. 2008. Role of impression cytology in diagnosis of ocular surface neoplasia. Cornea. Apr; (3): 269-74.
234. Tardón, R., Figueroa, P., Merino, V., Islas, A. 2011. Citología de impresión de la conjuntiva bulbar y córnea en gatos. Póster CLOVE 2011.
235. Tharp, M.D. 2002. Calcineurin Inhibitors. Dermatologic Therapy. Ed. Blackwell Publishing, Inc. Vol. 15: 325-332.
236. Thatcher, R.W., Darougar, S., Jones, B.R. 1977. Conjunctival impression cytology. Arch. Ophthalmol. 95: 678-81.
237. Thiel, M.A., Bossart, W., Bernauer, W. 1997. Improved impression cytology techniques for the immunopathological diagnosis of superficial viral infections. Br. J. Ophthalmol. Nov; 81 (11): 984-8.
238. Thoft, R.A., Friend, J. 1983. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 24 (10): 1442-1443.

Bibliografia

239. Tiffany, J.M, Pandit, J.C, Bron, A.J. 1996. Soluble mucins and the physical properties of tears. (Abstract 3901). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (ARVO Suppl). 37: S845.
240. Tole, D.M., McKelvie, P.A., Daniell, M. 2001. Reliability of impression cytology for the diagnosis of ocular surface squamous neoplasia employing the Biopore membrane. Br. J. Ophthalmol. Feb; 85 (2): 154-8.
241. Tseng, S.C., Hatchell, D., Tierney, N., Huang, A.J., Sun, T.T. 1984. Expression of specific keratin markers by rabbit corneal, conjunctival, and esophageal epithelia during vitamin A deficiency. J. Cell. Biol. Dec. 99 (6): 2279-86.
242. Tseng, S.C., Hirst, L.W., Maumenee, A.E., Kenyon, K.R., Sun, T.T., Green, W.R. 1984. Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin-deficient disorders. Ophthalmology. Jun; 91 (6): 545-52.
243. Tseng, S.C. 1985. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. Ophthalmology 92 (6): 728-733.
244. Tseng, S.C. 1989. Concept and application of limbal stem cells. Eye (Lond). 3 (Pt 2): 141-57.
245. Tseng, S.C. 1996. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. Mol. Biol. Rep. 23: 47-58.
246. Tsubota, K. 1991. The importance of the Schirmer test with nasal stimulation. Am. J. Ophthalmol. 111: 106-108.
247. Tsubota, K., Saito, I., Ishimaru, N., Hayashi, Y. 1998. Use of topical cyclosporine A in a primary Sjögren's syndrome mouse model. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 39: 1551-59.
248. Turner, A.W, Layton, C.J., Bron, A.J. 2005. Survey of eye practitioners attitudes towards diagnostic test and therapies for dry eye disease. Clin. Experiment. Ophthalmol. 33: 351-355.
249. Turner, K., Pflugfelder, S.C., Ji, Z., et al. 2000. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion [In Process Citation]. Cornea 19: 492-96.
250. Vadrevu, V.L., Fullard, R.J. 1994 .Enhancements to the conjunctival impression cytology technique and examples of applications in a clinico-biochemical study of dry eye. CLAO J. Jan; 20 (1): 59-63.
251. Vanley, G.T., Leopold, I.H., Gregg, T.H. 1977. Interpretation of tear breakup time. Arch. Ophthalmol. 95: 445-448.
252. Wander, A.H., Masukawa T. 1981. Unusual appearance of condensed chromatin in conjunctival cells in superior limbic keratoconjunctivitis. Lancet. 11: 42-3.

253. Waterman, S.A., Gordon, T.P., Rischmueller, M., 2000. Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 43: 1647-1654.
254. West-Mays, J.A., Dwivedi, D.J. 2006. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38 (10): 1625-31.
255. Wilcock, B.P. in McGavin, D., Zachary, J.F. 2007. *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* Mosby-Elsevier. St. Louis. Chapter 20: 1193-1244.
256. Williams, K.A., Brereton, H.M., Aggarwal, R., Sykes, P.J., Turner, D.R., Russ, G.R., Coster, D.J. 1995. Use of DNA polymorphisms and the polymerase chain reaction to examine the survival of a human limbal stem cell allograft. *Am. J. Ophthalmol.* 120: 342-50.
257. Wilson, G. 1994. The effect of hypoxia on the shedding rate of the corneal epithelium. *Curr. Eye Res.* 13 (6): 409-413.
258. Wilson, G., Ren, H., Laurent, J. 1995. Corneal epithelial fluorescein staining. *J. Am. Optom. Assoc.* 66: 435-441.
259. Wilson, S.E., Mohan, R.R., Mohan, R.R., Ambrosio Jr., R., Hong, J., Lee, J. 2001. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog. Retin. Eye Res.* 20: 625-637.
260. Wittpenn, J.R., Tseng, S.C., Sommer, A. 1996. Detection of early xerophthalmia by impression cytology. *Arch. Ophthalmol.* 104: 237-39.
261. Wyman, M., Gilger, B., Mueller, P. et al. 1995. Clinical evaluation of a new Schirmer tear test in the dog. *Veterinary Comparative Ophthalmology* 5 (4): 211-214.
262. Yamamoto, H., Sims, N.E., Macauley, S.P., Nguyen, K.H., Nakagawa, Y., Humphreys-Beher, M.G., 1996. Alterations in the secretory response of non-obese diabetic (NOD) mice to muscarinic receptor stimulation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 78: 245-255.
263. Yeo, A.C., Carkeet, A., Carney, L.G., Yap, M.K. 2003. Relationship between goblet cell density and tear function tests. *Ophthalmic Physiol. Opt.* 23 (1): 87-94.
264. Zengin, N., Tol, H., Gunduz, K. et al. 1995. Meibomian gland dysfunction and tear film abnormalities in rosacea. *Cornea.* 14: 144-146.
265. Zoukhri, D., Hodges, R.R., Byon, D., Kublin, C.L., 2002. Role of proinflammatory cytokines in the impaired lacrimation associated with autoimmune xerophthalmia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 1429-1436.
266. Zoukhri, D., Kublin, C.L. 2002. Impaired neurotransmission in lacrimal and salivary glands of a murine model of Sjögren's syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 506 (PtB): 1023-8.

Bibliografia

267. Zouhkri, D. 2006. Effect of inflammation on lacrimal gland function. Exp. Eye. Res. 82:885-898.

ANEXO

11.1. TABLA DESCRIPTIVA DE MEDIDAS CELULARES POR PERRO

| LISTADO DE DATOS FINALES | | | | | | | | 1 |
|--------------------------|--------------|-------|---------|-----------|----------|---------|-----------|---|
| Obs | PERRO | GRUPO | CITO_OD | NUCLEO_OD | RATIO_OD | CITO_OI | NUCLEO_OI | |
| 1 | BRIGI | II | . | . | . | 826.98 | 70.940 | |
| 2 | CHANEL | II | 1278.64 | 66.587 | 19.7359 | 1316.85 | 74.194 | |
| 3 | COCO COSLADA | II | 1157.63 | 84.398 | 14.2450 | . | . | |
| 4 | CUCA | II | . | . | . | 1109.83 | 118.171 | |
| 5 | IRIS | II | 936.13 | 73.608 | 13.8391 | . | . | |
| 6 | JESSI | II | 1383.28 | 111.945 | 12.9309 | 1067.64 | 42.782 | |
| 7 | KIARA | II | 1184.15 | 100.896 | 12.8475 | . | . | |
| 8 | KUMA | II | 1052.44 | 69.129 | 17.1240 | 1412.49 | 62.205 | |
| 9 | LINDA MEST | II | 1045.45 | 45.292 | 24.7490 | 1063.57 | 56.545 | |
| 10 | LUIGI | II | . | . | . | 1275.62 | 54.140 | |
| 11 | OTTO | II | 1128.40 | 63.811 | 20.0859 | 974.01 | 56.899 | |
| 12 | SHASHA | II | 1230.56 | 81.730 | 15.4754 | 1182.05 | 76.611 | |
| 13 | VALERIA | II | 923.78 | 58.302 | 19.8439 | 1549.45 | 63.362 | |
| 14 | WILMA | II | 1236.54 | 92.725 | 14.0574 | 1230.64 | 106.435 | |

| Obs | RATIO_OI | cito | nucleo | ratio | sd_cito_od | sd_nucleo_od | sd_ratio_od |
|-----|----------|---------|---------|---------|------------|--------------|-------------|
| 1 | 11.9836 | 826.98 | 70.940 | 11.9836 | . | . | . |
| 2 | 18.8167 | 1297.75 | 70.391 | 18.7602 | 316.077 | 13.809 | 5.0401 |
| 3 | . | 1157.63 | 84.398 | 14.2450 | 262.805 | 22.199 | 3.7302 |
| 4 | 11.8513 | 1109.83 | 118.171 | 11.8513 | . | . | . |
| 5 | . | 936.13 | 73.608 | 13.8391 | 230.300 | 23.696 | 5.0630 |
| 6 | 30.7064 | 1225.46 | 77.363 | 16.4689 | 372.793 | 31.961 | 3.9621 |
| 7 | . | 1184.15 | 100.896 | 12.8475 | 283.830 | 29.930 | 5.5930 |
| 8 | 30.6130 | 1232.47 | 65.667 | 21.4543 | 376.689 | 25.583 | 9.0332 |
| 9 | 20.5652 | 1054.51 | 50.918 | 21.5534 | 256.326 | 14.353 | 8.5947 |
| 10 | 27.7481 | 1275.62 | 54.140 | 27.7481 | . | . | . |
| 11 | 18.7507 | 1051.21 | 60.355 | 18.4628 | 245.807 | 29.341 | 7.6601 |
| 12 | 15.9473 | 1206.31 | 79.170 | 15.4330 | 202.929 | 14.309 | 3.9056 |
| 13 | 30.8748 | 1236.61 | 60.832 | 22.4838 | 235.559 | 23.778 | 14.3278 |
| 14 | 12.6577 | 1233.59 | 99.580 | 12.7988 | 303.220 | 24.991 | 4.3155 |

| Obs | oi | oi | oi | sd_cito_sd_cito | sd_nucleo_sd_nucleo | sd_ratio_sd_ratio |
|-----|---------|---------|---------|-----------------|---------------------|-------------------|
| 1 | 143.696 | 13.3274 | 2.7231 | 143.696 | 13.3274 | 2.7231 |
| 2 | 303.237 | 19.2956 | 6.9364 | 227.647 | 12.0080 | 3.5963 |
| 3 | . | . | . | 262.805 | 22.1994 | 3.7302 |
| 4 | 402.045 | 70.0947 | 6.9712 | 402.045 | 70.0947 | 6.9712 |
| 5 | . | . | . | 230.300 | 23.6957 | 5.0630 |
| 6 | 221.948 | 22.4079 | 14.8832 | 213.606 | 18.4646 | 3.8855 |
| 7 | . | . | . | 283.830 | 29.9297 | 5.5930 |
| 8 | 388.216 | 32.5347 | 19.8097 | 249.710 | 23.0983 | 9.8390 |
| 9 | 242.172 | 16.8006 | 8.6846 | 153.860 | 10.4100 | 5.6158 |
| 10 | 229.016 | 21.0164 | 13.3874 | 229.016 | 21.0164 | 13.3874 |
| 11 | 202.984 | 18.0187 | 6.7249 | 162.168 | 16.8418 | 5.0653 |
| 12 | 247.085 | 15.4629 | 4.5820 | 156.805 | 9.6271 | 2.6279 |
| 13 | 328.337 | 33.2001 | 17.2302 | 212.245 | 20.3330 | 8.3129 |
| 14 | 345.213 | 35.1817 | 5.1332 | 221.620 | 21.5239 | 2.8944 |

| LISTADO DE DATOS FINALES | | | | | | | | 2 |
|--------------------------|----------|-------|---------|-----------|----------|---------|-----------|---|
| Obs | PERRO | GRUPO | CITO_OD | NUCLEO_OD | RATIO_OD | CITO_OI | NUCLEO_OI | |
| 15 | COCO | II | 2317.70 | 133.378 | 18.4469 | . | . | |
| 16 | EICO | II | . | . | . | 1385.89 | 94.408 | |
| 17 | KENZO | II | . | . | . | 1821.65 | 101.712 | |
| 18 | LINDA | II | . | . | . | 1157.81 | 79.884 | |
| 19 | LOLA | II | . | . | . | 1100.26 | 71.224 | |
| 20 | LUCAS | II | 1114.91 | 77.770 | 16.7573 | . | . | |
| 21 | LUCI LIU | II | 1095.33 | 98.556 | 12.1016 | 1902.63 | 147.860 | |
| 22 | MAFALDA | II | 1454.77 | 103.227 | 16.6250 | 871.14 | 62.204 | |
| 23 | MAYA | II | 987.90 | 72.407 | 14.2709 | 1699.14 | 117.707 | |
| 24 | NALA | II | 1511.58 | 108.562 | 14.5677 | 1123.70 | 89.796 | |
| 25 | NICA | II | 891.32 | 42.993 | 23.4604 | 864.27 | 47.965 | |
| 26 | POPI | II | 908.02 | 58.101 | 16.4156 | 908.99 | 45.139 | |
| 27 | SIMBA | II | . | . | . | 1497.49 | 85.704 | |
| 28 | TIZON | II | 1752.52 | 113.381 | 16.9203 | . | . | |

| Obs | RATIO_OI | cito | nucleo | ratio | sd_cito_od | sd_nucleo_od | sd_ratio_od |
|-----|----------|------|--------|-------|------------|--------------|-------------|
|-----|----------|------|--------|-------|------------|--------------|-------------|

Anexo

| | | | | | | | |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|
| 15 | . | 2317.70 | 133.378 | 18.4469 | 460.569 | 32.792 | 6.2613 |
| 16 | 16.2634 | 1385.89 | 94.408 | 16.2634 | . | . | . |
| 17 | 18.7418 | 1821.65 | 101.712 | 18.7418 | . | . | . |
| 18 | 15.2945 | 1157.81 | 79.884 | 15.2945 | . | . | . |
| 19 | 16.2310 | 1100.26 | 71.224 | 16.2310 | . | . | . |
| 20 | . | 1114.91 | 77.770 | 16.7573 | 395.269 | 45.761 | 6.9154 |
| 21 | 14.3694 | 1498.98 | 123.208 | 12.8393 | 349.864 | 38.083 | 4.7847 |
| 22 | 15.4610 | 1162.95 | 82.715 | 14.9991 | 310.931 | 43.022 | 8.9489 |
| 23 | 15.4401 | 1343.52 | 95.057 | 14.5496 | 381.429 | 26.651 | 4.4731 |
| 24 | 13.0029 | 1317.64 | 99.179 | 13.5597 | 384.833 | 30.950 | 4.0218 |
| 25 | 22.1569 | 877.80 | 45.479 | 20.6982 | 269.631 | 14.535 | 12.3339 |
| 26 | 22.1042 | 908.50 | 51.620 | 18.1948 | 224.585 | 15.291 | 5.2316 |
| 27 | 17.8240 | 1497.49 | 85.704 | 17.8240 | . | . | . |
| 28 | . | 1752.52 | 113.381 | 16.9203 | 633.213 | 41.987 | 9.5348 |

| Obs | oi | oi | oi | sd_cito_oi | sd_nucleo_oi | sd_ratio_oi |
|-----|---------|---------|---------|------------|--------------|-------------|
| 15 | . | . | . | 460.569 | 32.7915 | 6.26126 |
| 16 | 384.525 | 32.3814 | 6.9262 | 384.525 | 32.3814 | 6.92618 |
| 17 | 327.890 | 19.7929 | 5.7323 | 327.890 | 19.7929 | 5.73229 |
| 18 | 427.950 | 23.2066 | 6.2076 | 427.950 | 23.2066 | 6.20758 |
| 19 | 217.107 | 21.7114 | 3.8506 | 217.107 | 21.7114 | 3.85058 |
| 20 | . | . | . | 395.269 | 45.7606 | 6.91537 |
| 21 | 310.313 | 49.7623 | 6.1655 | 204.003 | 31.5228 | 3.27343 |
| 22 | 346.088 | 26.9775 | 6.9625 | 243.239 | 23.9138 | 4.55203 |
| 23 | 760.070 | 43.0075 | 8.7056 | 408.458 | 23.3810 | 4.61185 |
| 24 | 402.606 | 27.5496 | 4.0541 | 271.496 | 17.7824 | 3.03045 |
| 25 | 234.418 | 21.2044 | 12.6110 | 161.365 | 12.4997 | 6.67117 |
| 26 | 187.071 | 15.4556 | 7.5061 | 133.525 | 10.9243 | 3.87591 |
| 27 | 620.013 | 27.0042 | 6.0444 | 620.013 | 27.0042 | 6.04438 |
| 28 | . | . | . | 633.213 | 41.9874 | 9.53484 |

LISTADO DE DATOS FINALES

3

| Obs | PERRO | GRUPO | CITO_OD | NUCLEO_OD | RATIO_OD | CITO_OI | NUCLEO_OI |
|-----|-----------|-------|---------|-----------|----------|---------|-----------|
| 29 | WILLIAM | II | . | . | . | 1331.88 | 89.138 |
| 30 | BILLY | I | 2161.32 | 142.566 | 15.4151 | 2108.63 | 159.400 |
| 31 | BIMBA | I | 1859.26 | 163.331 | 11.7865 | 1892.19 | 144.675 |
| 32 | BLANCA | I | 2036.60 | 141.981 | 14.4644 | 1995.50 | 143.698 |
| 33 | BOLITA | I | 1570.35 | 95.955 | 16.5836 | 1501.03 | 98.246 |
| 34 | CAIFAS | I | 1700.54 | 142.033 | 12.0647 | 1911.85 | 147.299 |
| 35 | CAPRICHO | I | 1733.36 | 170.660 | 11.9014 | 1495.74 | 127.454 |
| 36 | CHITA | I | 1982.31 | 158.001 | 12.6309 | 2016.95 | 137.082 |
| 37 | CLOE | I | 1745.46 | 152.234 | 11.6865 | 1963.29 | 157.107 |
| 38 | CLOE ROSA | I | 1695.51 | 140.108 | 12.4350 | 1821.44 | 133.081 |
| 39 | DIANA | I | 1590.88 | 131.841 | 12.2000 | 1771.94 | 142.942 |
| 40 | FOSCO | I | 1793.56 | 116.640 | 15.6098 | 1757.93 | 140.256 |
| 41 | FRITANGA | I | 1780.36 | 124.482 | 14.4800 | 1776.67 | 128.600 |
| 42 | GOLDEN | I | 1666.55 | 121.735 | 13.9603 | 1563.57 | 124.148 |

| Obs | RATIO_OI | cito | nucleo | ratio | sd_cito_oi | sd_nucleo_oi | sd_ratio_oi |
|-----|----------|---------|---------|---------|------------|--------------|-------------|
| 29 | 15.4494 | 1331.88 | 89.138 | 15.4494 | . | . | . |
| 30 | 13.3848 | 2134.98 | 150.983 | 14.2272 | 314.364 | 23.213 | 2.5059 |
| 31 | 13.3226 | 1875.72 | 154.003 | 12.3522 | 212.267 | 33.274 | 2.4472 |
| 32 | 13.9627 | 2016.05 | 142.839 | 14.1607 | 273.785 | 19.581 | 1.8052 |
| 33 | 15.6393 | 1535.69 | 97.100 | 15.9512 | 194.831 | 12.467 | 2.6615 |
| 34 | 13.1147 | 1806.19 | 144.666 | 12.5531 | 231.851 | 16.031 | 1.7258 |
| 35 | 11.8534 | 1614.55 | 149.057 | 11.7410 | 239.602 | 181.688 | 2.5658 |
| 36 | 14.9640 | 1999.63 | 147.542 | 13.6022 | 357.041 | 23.405 | 1.9618 |
| 37 | 12.7413 | 1854.38 | 154.670 | 12.1148 | 222.823 | 24.745 | 2.0231 |
| 38 | 14.0550 | 1758.47 | 136.595 | 12.9772 | 195.546 | 24.743 | 2.5439 |
| 39 | 12.4888 | 1681.41 | 137.392 | 12.3247 | 192.165 | 19.946 | 1.4282 |
| 40 | 12.6417 | 1775.75 | 128.448 | 13.8956 | 216.090 | 14.511 | 2.7113 |
| 41 | 14.1795 | 1778.52 | 126.541 | 14.1677 | 333.153 | 18.005 | 2.7901 |
| 42 | 12.8149 | 1615.06 | 122.942 | 13.2650 | 217.657 | 18.979 | 2.5524 |

| Obs | oi | oi | oi | sd_cito_oi | sd_nucleo_oi | sd_ratio_oi |
|-----|---------|---------|--------|------------|--------------|-------------|
| 29 | 265.433 | 20.5500 | 3.6151 | 265.433 | 20.5500 | 3.61506 |
| 30 | 266.727 | 21.6216 | 2.0001 | 186.297 | 13.3635 | 1.58727 |
| 31 | 244.478 | 20.3978 | 2.4969 | 165.203 | 19.0228 | 1.81096 |
| 32 | 220.276 | 14.6703 | 1.5719 | 198.278 | 13.8055 | 1.18539 |
| 33 | 257.194 | 15.8582 | 3.6160 | 165.601 | 9.2896 | 2.30429 |
| 34 | 239.520 | 18.5081 | 1.9373 | 167.146 | 12.6071 | 1.37971 |
| 35 | 219.688 | 18.6636 | 1.7033 | 162.674 | 91.5134 | 1.93188 |
| 36 | 317.164 | 22.1706 | 2.7035 | 280.940 | 16.6888 | 1.62416 |
| 37 | 248.996 | 24.0039 | 2.2684 | 154.243 | 17.8424 | 1.48426 |
| 38 | 245.723 | 23.2937 | 2.9949 | 168.339 | 13.8706 | 1.57456 |
| 39 | 191.236 | 18.6349 | 1.1948 | 132.684 | 16.0991 | 0.99609 |
| 40 | 194.836 | 15.0350 | 1.7075 | 129.958 | 9.5990 | 1.39025 |
| 41 | 226.752 | 23.4391 | 2.6275 | 191.557 | 14.0578 | 1.77071 |
| 42 | 204.289 | 21.6759 | 1.8954 | 137.222 | 14.4957 | 1.53637 |

LISTADO DE DATOS FINALES

4

| Obs | PERRO | GRUPO | CITO_OD | NUCLEO_OD | RATIO_OD | CITO_OI | NUCLEO_OI |
|-----|----------|-------|---------|-----------|----------|---------|-----------|
| 43 | GORDI | I | 1740.83 | 123.977 | 14.2925 | 1541.79 | 115.779 |
| 44 | JEFA | I | 1338.91 | 114.780 | 11.7955 | 1553.97 | 137.568 |
| 45 | KIRA | I | 1742.86 | 128.190 | 13.6522 | 1512.33 | 126.530 |
| 46 | KIWI | I | 1509.96 | 111.033 | 13.8427 | 1659.87 | 122.794 |
| 47 | LEOPOLDO | I | 1462.25 | 116.745 | 12.8098 | 1547.84 | 128.726 |
| 48 | LETI | I | 1679.68 | 117.252 | 14.5052 | 1875.79 | 138.111 |
| 49 | LULU | I | 1816.80 | 143.375 | 12.7061 | 1804.98 | 136.967 |
| 50 | NELA | I | 1935.38 | 121.964 | 15.9485 | 1736.81 | 118.708 |
| 51 | NIMA | I | 1856.00 | 117.310 | 16.0335 | 2219.55 | 124.088 |
| 52 | NIÑO | I | 1454.77 | 119.170 | 12.4187 | 1779.75 | 118.767 |
| 53 | NORA | I | 1725.87 | 123.475 | 14.1912 | 1503.54 | 104.205 |
| 54 | ODIE | I | 1582.07 | 134.969 | 11.7737 | 1427.46 | 122.350 |
| 55 | PANCHO | I | 1209.60 | 103.226 | 11.8133 | 1606.27 | 119.666 |

| Obs | RATIO_OI | cito | nucleo | ratio | sd_cito_od | sd_nucleo_od | sd_ratio_od |
|-----|----------|---------|---------|---------|------------|--------------|-------------|
| 43 | 13.4483 | 1641.31 | 119.878 | 13.7659 | 338.162 | 21.856 | 2.9466 |
| 44 | 11.4145 | 1446.44 | 126.174 | 11.5471 | 212.270 | 17.038 | 1.8810 |
| 45 | 12.1240 | 1627.60 | 127.360 | 12.8330 | 233.530 | 13.359 | 1.7255 |
| 46 | 13.7704 | 1584.91 | 116.914 | 13.6855 | 167.028 | 15.631 | 2.4690 |
| 47 | 12.1197 | 1505.04 | 122.735 | 12.3593 | 275.415 | 25.928 | 2.1656 |
| 48 | 13.7817 | 1777.73 | 127.682 | 14.0427 | 241.656 | 15.275 | 2.4470 |
| 49 | 13.3357 | 1810.89 | 140.171 | 12.9624 | 276.267 | 14.393 | 1.7441 |
| 50 | 14.7504 | 1836.10 | 120.336 | 15.3016 | 418.757 | 21.162 | 2.6151 |
| 51 | 18.3356 | 2037.77 | 120.699 | 17.0729 | 235.181 | 16.320 | 2.5593 |
| 52 | 15.2311 | 1617.26 | 118.969 | 13.7547 | 225.883 | 20.866 | 2.1416 |
| 53 | 14.6241 | 1614.71 | 113.840 | 14.2653 | 312.629 | 15.781 | 2.7784 |
| 54 | 11.7240 | 1504.76 | 128.660 | 11.7121 | 185.167 | 13.335 | 1.3193 |
| 55 | 13.4350 | 1478.79 | 122.452 | 12.1547 | 273.931 | 15.720 | 2.3340 |
| 56 | 13.5875 | 1407.93 | 111.446 | 12.6882 | 156.141 | 10.337 | 1.8095 |

| Obs | oi | oi | oi | sd_cito_sd_cito | sd_nucleo_sd_nucleo | sd_ratio_sd_ratio |
|-----|---------|---------|--------|-----------------|---------------------|-------------------|
| 43 | 297.163 | 19.3908 | 2.2431 | 232.892 | 15.5036 | 1.61163 |
| 44 | 219.786 | 17.8500 | 1.7541 | 152.478 | 14.1452 | 1.30877 |
| 45 | 238.405 | 19.1780 | 2.1672 | 163.754 | 10.9757 | 1.36082 |
| 46 | 147.959 | 16.8518 | 2.3360 | 107.957 | 12.3843 | 1.60888 |
| 47 | 214.484 | 16.2936 | 1.6587 | 185.630 | 16.4946 | 1.39028 |
| 48 | 279.964 | 18.7238 | 2.5626 | 172.178 | 14.0395 | 1.69973 |
| 49 | 271.314 | 19.0718 | 2.2903 | 203.820 | 12.8247 | 1.35188 |
| 50 | 314.277 | 15.2494 | 2.7674 | 273.363 | 13.0783 | 1.91502 |
| 51 | 284.694 | 21.0243 | 3.5095 | 157.283 | 13.7869 | 2.13091 |
| 52 | 226.393 | 18.2925 | 2.5236 | 143.839 | 15.6415 | 1.68562 |
| 53 | 304.756 | 15.1220 | 3.1861 | 224.294 | 9.8699 | 2.12764 |
| 54 | 283.135 | 16.5375 | 2.0651 | 185.300 | 11.3440 | 1.15079 |
| 55 | 216.257 | 16.8583 | 2.4729 | 183.437 | 10.3615 | 1.81749 |
| 56 | 175.984 | 13.5383 | 2.0842 | 124.961 | 7.9050 | 1.36754 |

LISTADO DE DATOS FINALES

5

| Obs | PERRO | GRUPO | CITO_OD | NUCLEO_OD | RATIO_OD | CITO_OI | NUCLEO_OI |
|-----|---------|-------|---------|-----------|----------|---------|-----------|
| 57 | RON | I | 2404.50 | 148.379 | 16.4153 | . | . |
| 58 | SMEAGOL | I | 1500.33 | 135.723 | 11.0947 | 1343.51 | 118.583 |
| 59 | WINNIE | I | 1411.23 | 140.051 | 10.1198 | 1514.90 | 136.673 |
| 60 | WOLFI | I | 2017.51 | 153.649 | 13.2147 | 1838.17 | 139.484 |

| Obs | RATIO_OI | cito | nucleo | ratio | sd_cito_od | sd_nucleo_od | sd_ratio_od |
|-----|----------|---------|---------|---------|------------|--------------|-------------|
| 57 | . | 2404.50 | 148.379 | 16.4153 | 310.023 | 18.001 | 2.7477 |
| 58 | 11.4115 | 1421.92 | 127.153 | 11.2018 | 278.757 | 19.391 | 1.7017 |
| 59 | 11.1979 | 1463.06 | 138.362 | 10.6159 | 209.941 | 15.018 | 1.4449 |
| 60 | 13.3001 | 1927.84 | 146.566 | 13.2291 | 262.598 | 16.054 | 1.7799 |

| Obs | oi | oi | oi | sd_cito_sd_cito | sd_nucleo_sd_nucleo | sd_ratio_sd_ratio |
|-----|---------|---------|--------|-----------------|---------------------|-------------------|
| 57 | . | . | . | 310.023 | 18.0012 | 2.74772 |
| 58 | 225.205 | 16.8248 | 1.7641 | 193.396 | 12.9027 | 1.27024 |
| 59 | 217.066 | 18.0834 | 1.7025 | 143.087 | 10.5891 | 1.15662 |
| 60 | 310.914 | 20.7924 | 2.0772 | 194.442 | 12.8852 | 1.54777 |

