



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

**Departament de Medicina i Cirurgia Animals**

**Facultat de Veterinària**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

# ***Crioconservación de córnea y esclera a -20°C en diferentes especies animales***

Memoria presentada por:

**Daniel Costa Moya**

para optar al grado de

Doctor en Veterinaria

Bellaterra, 18 de mayo de 2015

Directoras de tesis:

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

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

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral titulada “***Crioconservación de córnea y esclera a -20°C en diferentes especies animales***”, la memoria de la cual es presentada por **Daniel Costa Moya** para optar al Grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo nuestra supervisión y, considerándola finalizada, autorizamos su presentación para que ésta sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado.

M<sup>a</sup> Teresa Peña Giménez

Marta Leiva Repiso

Barcelona, 18 de mayo de 2015

---

# *Agradecimientos*

---

*A mi madre, Agustina, al meu pare, Joan y a mi hermano, Carlos  
por estar siempre a mi lado.*

*A Rebeca por ser mi todo y seguirme en el camino pase lo que pase.*

*A mis directoras, Teresa y Marta, por su esfuerzo, ayuda y dedicación a la tesis.*

*A Isa y Fernando por cuidar de mí.*

*A Rodrigo y Joana por su apoyo y buena amistad.*

*A Adán por acompañarme estos años y por su colaboración con la parte gráfica.*

*A Maria i Mònica per recolçar-me i ajudar-me amb la tesi.*

*A Natàlia i Sergi per estar (físicament) al meu costat.*

*A Carol i José per ser una part molt important del treball.*

*A tots els que hagin compartit part d'aquest camí amb mí.*

*“Cada Dia En Sabem Més i Entenem Menys”*

*Albert Einstein*

---

# *Índice*

---

## Índice de contenidos

### **INTRODUCCIÓN, 16**

#### **1. Córnea, 17**

**1.1. Embriología de la córnea, 17**

**1.2. Anatomía de la córnea, 17**

**1.3. Función y fisiología de la córnea, 21**

#### **2. Esclera, 25**

**2.1. Embriología de la esclera, 25**

**2.2. Anatomía de la esclera, 25**

**2.3. Función y fisiología de la esclera, 27**

#### **3 Técnicas quirúrgicas de reemplazo corneal, 27**

**3.1. Trasplante corneal, 28**

**3.2. Trasplante de submucosa intestinal porcina (SIS), 31**

**3.3. Colgajo conjuntival, 32**

**3.4. Transposición corneoconjuntival/corneoescleral, 33**

**3.5. Trasplante de membrana amniótica, 34**

**3.6. Trasplante de otros materiales, 35**

#### **4. Técnicas quirúrgicas de reemplazo escleral, 35**

**4.1. Trasplante escleral, 35**

#### **5. Métodos de conservación, 36**

**5.1. Métodos de conservación corneal, 36**

**5.1.1. Conservación corneal en fresco, 37**

**5.1.2. Conservación corneal mediante hipotermia, 37**



## **RESULTADOS, 55**

### **1. Especie canina, 56**

#### **1.1. Resultados microbiológicos, 56**

**1.1.1. Resultados microbiológicos del tejido canino corneal criocongelado, 56**

**1.1.2. Resultados microbiológicos del tejido canino escleral criocongelado, 57**

#### **1.2. Resultados histológicos, 59**

**1.2.1. Resultados histológicos del tejido canino corneal criocongelado, 59**

**1.2.2. Resultados histológicos del tejido canino escleral criocongelado, 60**

#### **1.3. Microscopia electrónica de transmisión (MET), 61**

**1.3.1. MET en tejido canino corneal criocongelado, 61**

**1.3.2. MET en tejido canino escleral criocongelado, 63**

#### **1.4. TUNEL, 64**

### **2. Especie felina, 65**

#### **2.1. Resultados microbiológicos, 65**

**2.1.1. Resultados microbiológicos del tejido felino corneal criocongelado, 65**

**2.1.2. Resultados microbiológicos del tejido felino escleral criocongelado, 66**

#### **2.2. Resultados histológicos, 67**

2.2.1. Resultados histológicos del tejido felino corneal criocongelado,	67
2.2.2. Resultados histológicos del tejido felino escleral criocongelado,	68
2.3. Microscopia electrónica de transmisión (MET),	69
2.3.1. MET en tejido felino corneal criocongelado,	69
2.3.2. MET en tejido felino escleral criocongelado,	70
3. Especie equina,	72
3.1. Resultados microbiológicos,	72
3.1.1. Resultados microbiológicos del tejido equino corneal criocongelado,	72
3.1.2. Resultados microbiológicos del tejido equino escleral criocongelado,	73
3.2. Resultados histológicos,	74
3.2.1. Resultados histológicos del tejido equino corneal criocongelado,	74
3.2.2. Resultados histológicos del tejido equino escleral criocongelado,	75
3.3. Microscopia electrónica de transmisión (MET),	77
3.3.1. MET en tejido equino corneal criocongelado,	77
3.3.2. MET en tejido equino escleral criocongelado,	78
<b>DISCUSIÓN,</b>	<b>80</b>

**CONCLUSIONES, 88**

**FUTUROS ESTUDIOS, 90**

**RESUMEN, 92**

**ANEXOS, 95**

**Anexo 1, 96**

**Anexo 2, 97**

**Anexo 3, 98**

**Anexo 4, 99**

**Anexo 5, 100**

**Anexo 6, 105**

**Anexo 7, 108**

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 112**

## Índice de Tablas

**Tabla 1, 29**

**Tabla 2, 57**

**Tabla 3, 57**

**Tabla 4, 58**

**Tabla 5, 58**

**Tabla 6, 59**

**Tabla 7, 60**

**Tabla 8, 62**

**Tabla 9, 63**

**Tabla 10, 64**

**Tabla 11, 66**

**Tabla 12, 66**

**Tabla 13, 67**

**Tabla 14, 67**

**Tabla 15, 68**

**Tabla 16, 69**

**Tabla 17, 70**

**Tabla 18, 70**

**Tabla 19, 73**

**Tabla 20, 73**

**Tabla 21, 74**

**Tabla 22, 74**

**Tabla 23, 75**

**Tabla 24, 76**

**Tabla 25, 77**

**Tabla 26, 78**

## Índice de Figuras

**Figura 1, 17**

**Figura 2, 20**

**Figura 3, 22**

**Figura 4, 23**

**Figura 5, 33**

**Figura 6, 33**

**Figura 7, 34**

**Figura 8, 39**

**Figura 9, 40**

**Figura 10, 48**

**Figura 11, 50**

**Figura 12, 51**

**Figura 13, 60**

**Figura 14, 62**

**Figura 15, 62**

**Figura 16, 63**

**Figura 17, 64**

**Figura 18, 69**

**Figura 19, 71**

**Figura 20, 71**

**Figura 21, 76**

**Figura 22, 78**

**Figura 23, 79**

---

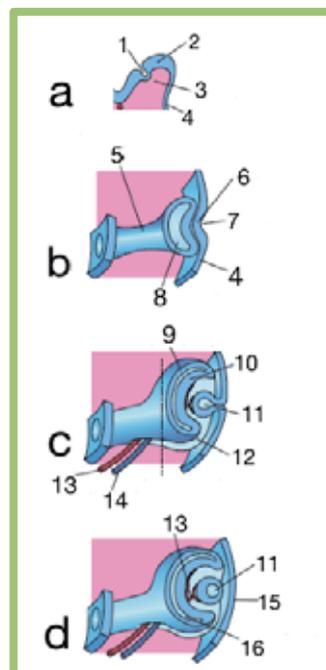
# *Introducción*

---

## 1. Córnea

### 1.1. Embriología de la córnea

El **ojo** (*organum visus*), se desarrolla a partir de la evaginación del neuroectodermo del prosencéfalo embrionario, formando el **surco óptico** (**Fig.1, nº1**). Al cerrarse el tubo neural, el surco se transforma en la **vesícula óptica**, que crecerá hasta contactar con el ectodermo superficial que la recubre.<sup>1</sup> Este contacto induce dos procesos: engrosamiento del ectodermo superficial, la llamada **placoda del cristalino** (**Fig.1, nº6**), e invaginación de la vesícula óptica, formando la denominada **copa óptica** (**Fig.1, nº8**). La placoda del cristalino se invagina dando lugar por un lado a la **vesícula del cristalino** (**Fig.1, nº11**) y por otro al **epitelio corneal** (**Fig.1, nº15**), que es la capa más externa de la córnea.<sup>2</sup>



**Figura 1:** Desarrollo embrionario del ojo. **a:** Sección mostrando el surco óptico. **1.** Surco óptico; **2.** Cresta neural; **3.** Mesénquima; **4.** Ectodermo superficial **b:** Sección mostrando el inicio de la invaginación del cristalino. **5.** Tallo óptico; **6.** Placoda del cristalino; **7.** Fovea del cristalino; **8.** Copa óptica. **c y d:** Secciones que muestran el desarrollo de la vesícula del cristalino y el epitelio corneal. **9.** Capa externa de la copa óptica; **10.** Capa interna de la copa óptica; **11.** Vesícula del cristalino; **12.** Fisura óptica; **13.** Arteria hialoidea; **14.** Vena hialoidea; **15.** Epitelio corneal; **16.** Espacio intraretiniano. Fuente: Remington LA[2005]: *Clinical Anatomy of the Visual System*, 2nd ed. Butterworth-Heinemann, St. Louis.

El ectodermo superficial que recubre la copa óptica, no solo da lugar al epitelio corneal, sino que a su vez secreta una matriz gruesa compuesta básicamente por material acelular (fibras de colágeno y glicosaminoglicanos), que constituirá parcialmente la segunda capa corneal (**estroma corneal primario**). El estroma continúa su formación mediante queratocitos que, provenientes de células de la **cresta neural**, migrarán entre el ectodermo superficial y la copa óptica. Son los queratocitos en desarrollo, quienes mediante la secreción de colágeno de tipo I y fibronectina, formarán el **estroma corneal secundario**.

La capa más profunda de la córnea, el **endotelio corneal** proviene, al igual que el estroma corneal, de la cresta neural. Es debido a este origen, que su capacidad mitótica es reducida o nula en la mayoría de las especies.<sup>2,3</sup>

Una vez finalizada la formación corneal, se inicia un proceso de deshidratación que finaliza con una marcada pérdida de fibronectina y la reducción del 50% del grosor estromal. Las células endoteliales, *per se*, juegan también un papel importante en la deshidratación estromal, mediante la formación de uniones “*zonula occludens*” entre células, y la formación de la **membrana de Descemet** (30-35 días de gestación en el perro). La deshidratación corneal va íntimamente unida a la transparencia corneal, adquiriendo el endotelio corneal pleno funcionamiento al nacimiento o tras la apertura palpebral, según la especie.

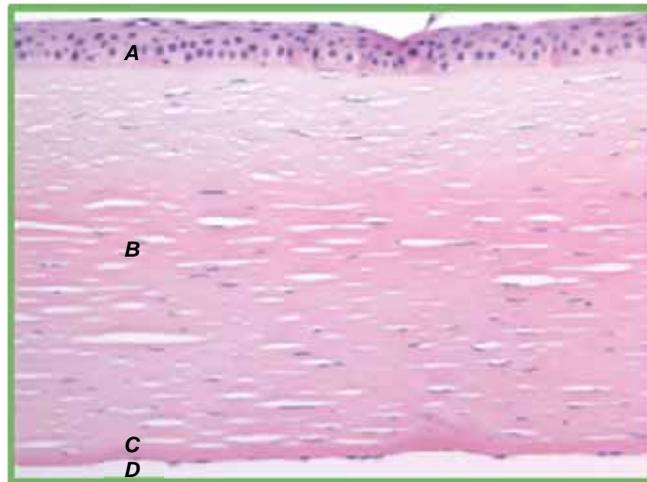
## 1.2. Anatomía de la córnea

La córnea es la estructura transparente, avascular y lisa que conforma el segmento anterior del globo ocular.<sup>4</sup> En las tres especies incluidas en esta tesis doctoral (perro, gato y caballo) la córnea tiene forma elíptica, con diámetro horizontal mayor que vertical - aunque en el perro y el gato esta diferencia es muy pequeña. En el caballo esta característica corneal le permite aumentar el campo visual horizontal notablemente.

El grosor corneal es muy variable entre especies, razas e incluso entre individuos. En la mayoría de especies domésticas es menor de 1 mm, siendo en el perro de 0,4 a 0,5 mm en el centro, y de 0,5 a 0,6 en la periferia; en el gato de 0,4 a 0,6 mm en el centro y de 0,8 a 1,0 mm en la periferia y, en el caballo de 0,8 en el centro y de 1,0 a 1,5 mm en la periferia.<sup>5</sup>

En las especies canina, felina y equina, la córnea se compone de 4 capas, siendo de fuera a dentro, las siguientes: **epitelio**, **estroma**, **membrana de Descemet** y **endotelio corneal** (Fig. 2).<sup>1,3</sup>

El **epitelio corneal** es un epitelio estratificado, escamoso y no queratinizado de 25-40 µm de grosor en los carnívoros domésticos y de 50-110 µm en los ungulados, que se encuentra en la parte más externa de la córnea. Se caracteriza por tener gran capacidad de regeneración; en unos minutos después de un trauma, las células de los márgenes de la lesión empiezan a migrar y cubrir el área afectada. El epitelio puede llegar a regenerarse completamente en 4-7 días.<sup>4</sup>



**Figura 2:** Sección histológica de la córnea canina. **A:** Epitelio. **B:** Estroma. **C:** Membrana de Descemet. **D:** Endotelio.

El **estroma corneal** es una estructura laminar transparente que ocupa el 90% del espesor corneal. Las lamelas, organizadas de forma precisa, se componen de 5 tipos de colágeno siendo el más común el colágeno tipo I, con pequeñas cantidades de tipo III, VI y XII. Entre éstas, se localizan los queratocitos y fibroblastos, que contribuyen a la formación y mantenimiento del estroma.

La **membrana de Descemet** es la membrana basal del endotelio corneal y se caracteriza por ser homogénea, acelular y por producirse a lo largo de toda la vida del individuo, incrementando su grosor con la edad.

El **endotelio** está formado por una monocapa de células hexagonales, que limita la córnea internamente. Se caracteriza por tener regeneración reducida o nula, dependiendo de la especie y edad del individuo.<sup>2,3</sup> Tras un insulto endotelial, las células colindantes migran y se expanden para cubrir el defecto, perdiendo de esta forma su hexagonalidad característica (polimorfismo endotelial), y reduciendo en cierta medida su funcionalidad.

Si la densidad endotelial se reduce de forma marcada (densidades inferiores a 500 cél/mm<sup>2</sup>) se inicia un proceso de descompensación endotelial que cursa con edema de córnea y afectando marcadamente a la agudeza visual. La densidad endotelial es un parámetro considerado de crucial importancia en la elección de tejido corneal donante (ver apartado “3.1. Trasplante corneal”).

La córnea es una de las estructuras **más inervadas del organismo**.<sup>6,7</sup> Está inervada por ramas de la división oftálmica del trigémino, los nervios ciliares largos, que presentan principalmente receptores del dolor o nociceptivos. En el perro se han descrito entre 14 y 18 ramas ciliares largas que se distribuyen en dos capas, una superficial localizada en estroma anterior con las terminaciones en el epitelio, y otra profunda, menos tupida, ubicada en el estroma posterior.<sup>6</sup>

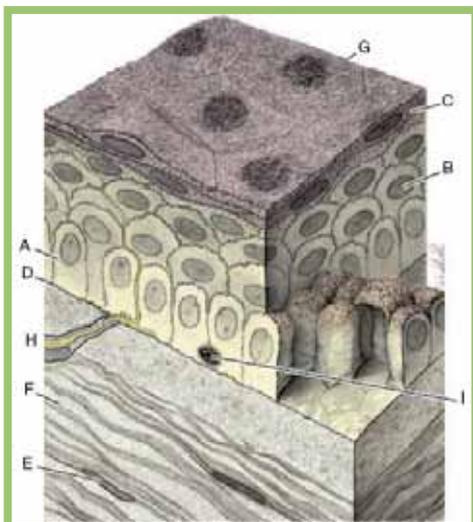
### ***1.3. Función y fisiología de la córnea***

La córnea tiene diversas funciones, entre ellas: **transmisión y refracción de la luz** (propiedades ópticas), **control de la permeabilidad** (propiedades de barrera), **soporte del contenido intraocular** (propiedades mecánicas), **distribución de fármacos y filtración de luz ultravioleta**.<sup>5,8</sup>

- **Propiedades ópticas.** La transparencia tisular es un atributo que se da raramente en el mundo animal, de hecho, en la mayoría de las especies, las únicas estructuras con esta propiedad se encuentran en el ojo (córnea, lente y vítreo).<sup>8</sup> En la córnea, la transparencia es una de las características más importantes, ya que permite la **transmisión de la luz**.

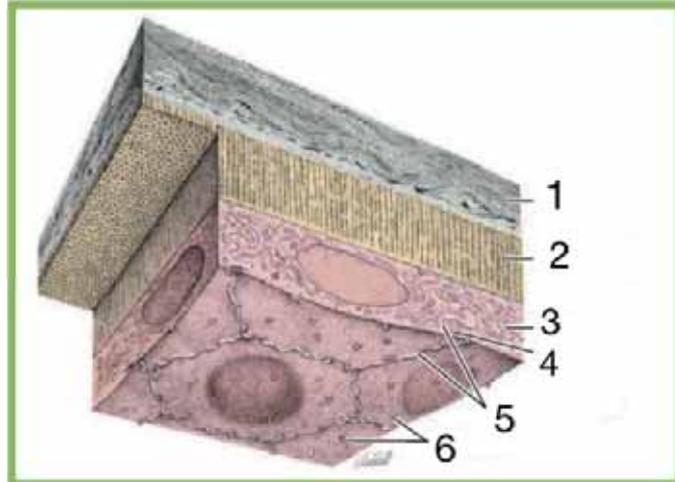
Los factores que contribuyen a ella son: falta de vasos sanguíneos, epitelio no queratinizado, ausencia de melanina y mielina, y máxima organización de las fibras de colágeno estromal.<sup>3,5</sup> El poder de **refracción** y las aberraciones inducidas por la óptica de la córnea son principalmente debidos a la curvatura corneal y al contorno. La superficie anterior de la córnea es básicamente esférica con el ápex definiendo el punto de mayor poder de refracción. El poder dióptrico total de la córnea central humana es de  $42,4 \pm 1,5D$  (oscilando entre 38,4 y 46,3D) del total de 60D de poder dióptrico del ojo. Se trata, por lo tanto, de la zona del ojo de mayor poder dióptrico, principalmente debido a la diferencia entre el índice de refracción del aire (1,000), córnea (1,376) y humor acuoso (1,336). En comparación, la diferencia entre índices de refracción es mucho menor para todas aquellas estructuras intraoculares -al ubicarse en un medio acuoso-, poseyendo éstas mucho menor poder dióptrico que la córnea.

- **Propiedades de barrera.** Las **barreras** principales de la córnea son el **epitelio** (barrera de baja permeabilidad) (Fig.3) y el **endotelio** (barrera de alta permeabilidad) (Fig.4).



**Figura 3:** Imagen del epitelio corneal compuesto por: **A:** células basales columnares. **B:** Células poliédricas aladas. **C:** Células epiteliales superficiales no queratinizadas. Las células basales se sustentan en la membrana basal (**D**). El estroma se compone de **E:** Queratocitos y **F:** colágeno. También se muestran los micropliegues y microvellosidades del epitelio corneal (**G**), una rama del nervio trigémino (**H**) y un linfocito (**I**) migrando a través de la membrana basal. (Modificado de Hogan MJ, et al. [1971]: *Histology of the Human Eye*. Saunders, Philadelphia.)

**Figura 4:** Imagen interna de la córnea mostrando las lamelas más profundas del estroma (1), la membrana de Descemet (2) y el endotelio (3) con sus células poligonales y sus microvellosidades (6). Las células están unidas por uniones fuertes (4) que protruyen y forman pliegues marginales (5). (Modificado de Hogan MJ, et al.[1971]: *Histology of the Human Eye*. Saunders, Philadelphia.)



El **epitelio** impide el movimiento de iones, y por lo tanto la entrada de fluido de la lágrima al estroma, reduce la evaporación y protege la córnea de patógenos. En **endotelio**, por su parte, mantiene la transparencia corneal regulando su hidratación y la nutrición a través de una barrera permeable y con bombas iónicas. Con el objetivo de mantener esta permeabilidad, la dotación endotelial, que en animales jóvenes es elevada, debe mantenerse parcialmente a lo largo de la vida. Si la densidad de células endoteliales (DCE) cae por debajo de 2000 cél/mm<sup>2</sup>, se pone en marcha un mecanismo de compensación, a través de bombas iónicas, que consigue mantener la córnea en su estado de deshidratación habitual. Si, por el contrario, la densidad alcanza 500 cél/mm<sup>2</sup>, el mecanismo compensatorio se ve sobrepasado, estableciéndose edema corneal difuso.<sup>3,4,8</sup>

A pesar de que algunos autores consideran que humanos y gatos tienen cierta capacidad de regeneración del endotelio corneal, la mayoría de especies animales, entre ellas la canina y la equina, no presentan capacidad de regeneración alguna.<sup>9,10</sup>

- **Propiedades mecánicas.** Otra de las propiedades de la córnea es la función **mecánica**. Debido a que el ojo es una cámara presurizada, la córnea representa un excelente equilibrio entre rigidez y fuerza, manteniendo la dureza para resistir las fuerzas internas y externas que pueden suponer un estrés, distorsionar su forma o poner en peligro su integridad.
- **Distribución de fármacos.** La instilación tópica de **fármacos** es el método más común para la administración de los tratamientos oculares, siendo las dos vías de penetración tópica principales la transcorneal y la transconjuntival. La penetración corneal de un fármaco depende en gran medida de su peso molecular, lipofilicidad y grado de ionización. Los fármacos que penetran la vía transcorneal con mayor facilidad son aquellos que tienen bajo peso molecular y son lipofílicos, mientras que los productos de mayor peso molecular e hidrofílicos suelen utilizar la vía transconjuntival.<sup>4</sup>
- Por último, la córnea también tiene la función de **filtrar** parte de la **radiación ultravioleta (UV)**. La proporción de absorción de la córnea depende de la longitud de onda y del ángulo de incidencia. La córnea absorbe el 100% de los rayos UV-C, el 90% de los UV-B y el 60% de los UV-A.<sup>8</sup>

## 2. Esclera

### 2.1. Embriología de la esclera

La **esclera** se forma a partir de la segunda oleada de células de las **crestas neurales**, por inducción de la capa externa de la **copa óptica** (futuro epitelio pigmentario de la retina). Así pues, el epitelio pigmentario de la retina y la coroides son responsables directos del desarrollo escleral.

Durante su desarrollo, la esclera va aumentando de grosor gradualmente (de anterior a posterior) y va densificando su matriz extracelular. Se compone inicialmente por fibroblastos, fibras de colágeno y proteoglicanos<sup>1,2</sup>, añadiéndose las fibras de elastina después del nacimiento en respuesta a la presión intraocular.<sup>8</sup> La maduración escleral continuará durante el desarrollo del animal (Fig. 1).<sup>2</sup>

### 2.2. Anatomía de la esclera

La esclera, también denominada esclerótica, conforma, junto con la córnea, la túnica fibrosa del globo ocular. Es una estructura más hidratada que la córnea y contiene vasos sanguíneos. Su grosor es variable según la especie y la zona, siendo la zona de inserción de los músculos extraoculares (ecuador), la zona más delgada. Su color depende del grosor y del contenido graso, siendo más azulado si es más fina y más amarillenta si es más grasa.<sup>4</sup> En la zona anterior del ojo, la esclera se une a la córnea y a la conjuntiva bulbar, formando una zona de transición, el **limbo**.

En la zona más posterior del ojo, la esclera presenta una zona agujereada que permite la salida de los axones de las células ganglionares que conforman el nervio óptico (lámina cribosa).<sup>3</sup>

La esclera está compuesta por tres capas, que de externa a interna, son: **epiesclera, estroma escleral y lámina fusca**.<sup>3</sup>

- La **epiesclera** es una capa fibrosa densa y muy vascular que une la cápsula de Tenon a la esclera. Sus fibras de colágeno se introducen parcialmente en el estroma escleral superficial. En su parte craneal, la epiesclera se engrosa y fusiona con la cápsula de Tenon y el tejido conectivo subconjuntival cerca del limbo esclerocorneal.<sup>3</sup>
- La composición del **estroma escleral** se asemeja al estroma corneal, aunque el colágeno escleral difiere en diámetro, forma y organización y puede presentar algunos melanocitos en la parte más cercana al limbo esclerocorneal.<sup>3,4</sup> Esta distribución menos organizada de las fibras de colágeno, induce pérdida de la transparencia escleral.<sup>3</sup>
- La **lámina fusca** es la capa más interna de la esclera que se caracteriza por su pigmento, que proviene de la coroides. Es la zona de transición entre la esclera y las capas externas de la coroides y del cuerpo ciliar.<sup>4</sup>

### ***2.3. Función y fisiología de la esclera***

La principal función de la esclera es **proporcionar resistencia al globo** para mantener su integridad y presión intraocular. A su vez, permite la salida de las fibras nerviosas que conforman el nervio óptico a través de la lámina cribosa; y la entrada de vasos sanguíneos y nervios hacia el interior del globo ocular.<sup>5,8</sup>

La capacidad de regeneración de la esclera -vehiculada por fibroblastos- es mayor que la de la córnea; formándose abundante tejido de granulación, que posteriormente se remodelará y reorganizará.<sup>8</sup>

### ***3. Técnicas quirúrgicas de reemplazo corneal***

Las **patologías corneales** son relativamente frecuentes en animales domésticos. En el **perro**, y de forma simple, las queratopatías pueden clasificarse en primarias o secundarias. Las queratopatías primarias más frecuentes son queratitis ulcerativas, degeneraciones y distrofias corneales. Las queratopatías secundarias suelen estar asociadas a anomalías palpebrales, tales como euriblefaron, entropión, ectropión, o a deficiencias lagrimales cualitativas o cuantitativas.<sup>3,11</sup> En el **gato**, las patologías corneales más frecuentes son queratitis ulcerativas inducidas por Herpesvirus felino tipo 1, secuestros corneales y queratitis eosinofílicas.<sup>11</sup> En el **caballo**, por la disposición lateralizada de los ojos, el carácter de los animales y el medio en el que habitan, las patologías corneales más frecuentes son las queratitis ulcerativas y queratitis fúngicas.<sup>12</sup>

Las anomalías congénitas y las neoplasias corneales son poco frecuentes en las tres especies. Las patologías anteriormente citadas pueden conducir a diferentes grados de opacificación o disrupción de la continuidad corneal, requiriendo en algunos casos tratamiento quirúrgico.

A continuación se describen las cirugías de reemplazo corneal más frecuentes.

### ***3.1. Trasplante corneal***

El **trasplante corneal**, también conocido como **queratoplastia** o **injerto corneal**, es el proceso quirúrgico más utilizado en oftalmología humana para el reemplazo corneal.<sup>13</sup>

El reemplazo quirúrgico corneal por una estructura artificial transparente fue citado por primera vez en 1789 por el **Dr Quensgsy**<sup>14</sup>, pero no fue hasta 1824 cuando el **Dr Reisinger** sugirió el uso de córneas animales para este propósito, procedimiento que llamó **queratoplastia**. A lo largo del siglo siguiente, la investigación en cirugía corneal reveló la necesidad de utilizar tejido homólogo para evitar la opacificación del injerto. Fue el Dr Zirm, un oftalmólogo checo, quien en 1906 realizó el primer trasplante de córnea en personas con éxito.<sup>15</sup> A partir de 1935, con la descripción de la utilización de tejido postmortem del Dr Flatov, la introducción del microscopio quirúrgico (1950) y la fabricación de instrumental quirúrgico delicado, se inició una nueva era en el campo de la cirugía corneal.<sup>13</sup>

Hoy en día, el trasplante corneal se considera la única técnica quirúrgica disponible para restablecer con éxito la transparencia corneal en patologías corneales tales como distrofias corneales agresivas, quemaduras corneales, herpesvirosis crónicas y tumores corneales.<sup>16-19</sup> Según la Organización Mundial de la Salud, cada año se llevan a cabo **120.000 trasplantes de córnea** en el mundo, siendo uno de los tejidos sólidos más comúnmente trasplantados.<sup>20</sup> Las queratoplastias pueden clasificarse en base a diferentes aspectos: **grosor de la córnea donante, especie donante, método de conservación y objetivo quirúrgico.**

- **Grosor de la córnea donante:** las queratoplastias se clasifican en **laminares o parciales** (parte del espesor de la córnea)<sup>21,22</sup> y **penetrantes o de espesor completo.**<sup>23-25</sup> Actualmente las técnicas de cirugía corneal más novedosas en la especie humana tienden a sustituir únicamente el tejido afectado (queratoplastia laminar), evitando las complicaciones postoperatorias asociadas a los injertos penetrantes.<sup>26</sup> Las técnicas de queratoplastia laminar más utilizadas actualmente quedan resumidas en la tabla 1.<sup>26,27</sup>

**Tabla 1:** Técnicas de queratoplastia laminar más utilizadas.

<b>Técnica</b>	<b>Acrónimo</b>
Queratoplastia laminar anterior: "Anterior Lamelar Keratoplasty"	ALK
Queratoplastia laminar anterior profunda: "Deep Anterior Lamelar Keratoplasty"	DALK
Queratoplastias endoteliales: "Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty"	DSEK
"Descemet Stripping Endothelial Automated Keratoplasty"	DSAEK
"Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty"	DMEK

- **Especie donante utilizada:** las queratoplastias se clasifican en **homólogas** (o aloinjerto, si el donante y receptor son de la misma especie),<sup>28,29</sup> **autólogas** (si el donante y el receptor son el mismo individuo)<sup>22,29</sup> o **heterólogas** (o xenoinjerto, si el donante y el receptor son de diferentes especies).<sup>23</sup>
- **Método de conservación:** las queratoplastias pueden ser **frescas** (el tejido se trasplanta pocas horas después de la extracción del donante), **refrigeradas** (se conserva a 4°C durante una semana), **en cultivo de órganos** (se conserva a 37°C, durante 30-40 días) o **criocongeladas** (el tejido se conserva a -20°C).<sup>13,21,23,24,30-32</sup> (Ver apartado “5. Métodos de conservación”)
- **Objetivo quirúrgico:** La queratoplastia persigue uno o varios objetivos simultáneamente, entre ellos: restablecer la visión (**queratoplastia visual**), restablecer la integridad del globo ocular (**queratoplastia tectónica**), eliminar cicatrices u opacidades corneales (**queratoplastia estética**) o tratar un proceso corneal activo (**queratoplastia terapéutica**).<sup>21,30,31,33</sup> Las queratoplastias tectónicas y terapéuticas son las más utilizadas en veterinaria, dejando las estéticas y visuales en un segundo plano.<sup>31,32,34</sup> A pesar de ello, es deseable que los injertos terapéuticos/tectónicos, además de restablecer la integridad corneal, puedan devolver la visión a los pacientes.

La transparencia corneal obtenida tras una queratoplastia, depende de varios factores, entre ellos; la **experiencia y técnica del cirujano** y el **estado y viabilidad del endotelio**.<sup>8</sup>

La viabilidad endotelial depende a su vez de la **dotación endotelial inicial** del donante y del **método de conservación utilizado**. Todos los métodos de conservación del tejido corneal (ver apartado 5) reducen, en diferente grado, no solo la densidad de células endoteliales (Ver apartado “6. Muerte celular”), sino también la de las epiteliales.

La elección de la especie donante viene determinada en gran medida por el método de conservación utilizado, requiriendo los métodos que mantienen la viabilidad endotelial, injertos homólogo o autólogo, y los que no lo hacen, heterólogos, autólogos u homólogos. En medicina veterinaria, debido entre otros motivos, a la falta de disponibilidad de tejido, las queratoplastias se realizan con menos frecuencia, siendo en muchos casos reemplazadas por otras técnicas, detalladas a continuación.

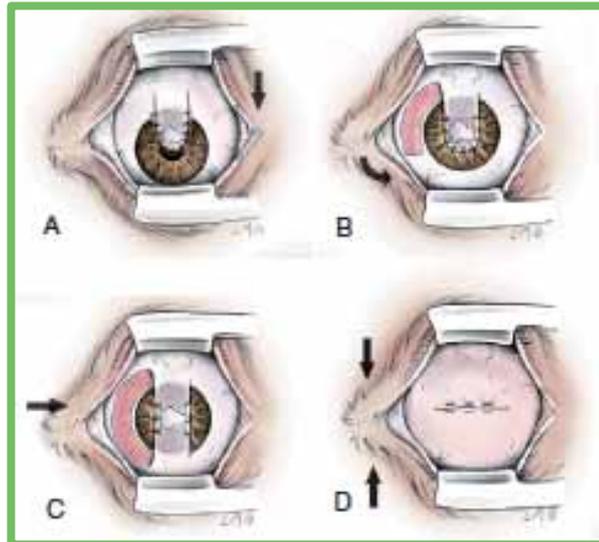
### ***3.2. Trasplante de submucosa intestinal porcina (SIS)***

La **submucosa de intestino delgado porcina (SIS)** es un biomaterial compuesto principalmente por proteínas y, en menor medida, por carbohidratos y lípidos. Este material proviene del yeyuno del cerdo que, una vez procesado y desbridado químicamente, resulta en una matriz de colágeno. Posteriormente, se esteriliza con óxido de etileno y se comercializa en diferentes tamaños y grosores.<sup>11</sup> La SIS proporciona una base para la cicatrización corneal, pudiendo combinarse, en los casos en los que sea necesario, con un colgajo conjuntival con la finalidad de aumentar el soporte tectónico y el aporte vascular.<sup>11</sup>

Se ha utilizado con éxito en perro, gato y caballo, obteniendo transparencia corneal en un porcentaje importante de los casos.<sup>35,36</sup>

### ***3.3. Colgajo conjuntival***

Los **colgajos conjuntivales** se utilizan con relativa frecuencia en las especies canina, felina y equina.<sup>37-39</sup> De forma simple, consisten en la transposición de conjuntiva a la zona del defecto corneal. En la mayoría de las ocasiones, la conjuntiva que se transpone es la bulbar, que es fina y semitransparente y no afecta a la movilidad palpebral. Los tipos de colgajos más utilizados en oftalmología veterinaria son el colgajo monopediculado, el colgajo bipediculado, el colgajo de avance o “Hood” y el colgajo en 360°, completo o también llamado Gundersen.<sup>11</sup> (Fig. 5) Las indicaciones para esta intervención son muy variadas, entre ellas úlceras corneales de diversa profundidad, queratomalacia, úlceras corneales micóticas, abscesos corneales, secuestros corneales... Es importante remarcar que el soporte tectónico proporcionado por el colgajo conjuntival es mucho menor que el de la queratoplastia, pudiendo no ser suficiente para mantener la integridad ocular en casos como úlceras profundas, descemetoceltes o perforaciones corneales.<sup>11</sup>



**Figura 5:** Tipos de colgajos conjuntivales más usados. **A:** de avance o Hood; **B:** Monopediculado; **C:** Bipediculado; **D:** en 360°. Adaptado de Slatter's *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*.

#### 3.4. Transposición corneoconjuntival/corneoscleral

La **transposición corneoconjuntival/corneoscleral** se realiza desplazando una zona periférica de la córnea y conjuntiva/esclera hacia el defecto central (Fig.6).<sup>11</sup> Se utiliza principalmente para tratar úlceras profundas, descemetocel y secuestros corneales profundos centrales o paracentrales, obteniéndose buen resultado visual en la zona desplazada, quedando opaca o translúcida la zona de la periferia.<sup>39,40</sup> No está indicada para el tratamiento quirúrgico de úlceras infectadas.<sup>11</sup>



**Figura 6:** Imagen final postquirúrgica de una transposición corneoconjuntival.

### 3.5. Trasplante de membrana amniótica

En veterinaria, la **membrana amniótica** (AmnioVet®) se ha utilizado para reparar y favorecer la regeneración tisular de defectos corneales profundos en caballo, gato y perro, obteniendo buenos resultados quirúrgicos y menor cicatriz que la obtenida mediante el colgajo conjuntival.<sup>41-43</sup> AmnioVet® es un biomaterial a base de membrana amniótica de bovino que ha sido obtenida y procesada mediante un depurado y meticuloso proceso de criopreservación. A diferencia de otros métodos de conservación, la criopreservación mantiene la valiosa actividad de las citoquinas y los factores de crecimiento del amnios. Esto comporta acciones biológicas únicas que estimulan la reparación tisular, reducen al mínimo las cicatrices, controlan la inflamación y disminuyen el dolor. Dichas características han demostrado ser de inestimable valor en la cirugía oftalmológica.<sup>11</sup> Una de las indicaciones para este tipo de intervención son las úlceras colagenasa positivo o queratomalacia, induciendo una cicatriz corneal mucho menor a la producida por otras técnicas utilizadas, tales como el colgajo conjuntival (Fig.7).



**Figura 7:** Imagen post-quirúrgica de la colocación de una membrana amniótica.

### ***3.6. Trasplante de otros materiales***

Para el reemplazo corneal se han utilizado otros materiales, la mayoría de forma experimental con resultados aceptables, siempre con un objetivo tectónico o terapéutico. Entre ellos se encuentran la cápsula renal, el pericardio o el goretex.<sup>44-46</sup>

## ***4. Técnicas quirúrgicas de reemplazo escleral***

Las patologías esclerales son menos frecuentes en veterinaria, siendo las más habituales masas corneoesclerales, escleritis y epiescleritis.<sup>5</sup> Las descripciones de reconstrucción escleral tanto en el perro, como en el gato o en el caballo, son escasas, siendo el más importante el trasplante escleral. También se han utilizado otros materiales como la submucosa intestinal porcina (SIS), colgajo de conjuntiva, cartílago de la membrana nictitante y goretex.<sup>24,28,44,47-49</sup>

### ***4.1. Trasplante escleral***

El **trasplante escleral** se utiliza esporádicamente en oftalmología veterinaria y humana. En humana, estos injertos esclerales son útiles, sobre todo, para cubrir la resección de tumores locales u otros procesos que requieran reconstrucción escleral para mantener la integridad del globo ocular. También se utilizan para cubrir sistemas de filtración o válvulas después de cirugía de glaucoma, o en casos de artritis reumatoide con adelgazamiento escleral.<sup>25,44,46,49-53</sup>

El éxito de la escleroplastia es similar al de la queratoplastia y las complicaciones son mínimas, siendo las más descritas: **uveítis anterior, ulceración corneal, hifema, fibrina intracameral, edema focal de retina, pigmentación corneal, cataratas, marcado tejido de granulación, discoria, lipidosis corneal y edema corneal.**<sup>47,48</sup>

## **5. Métodos de conservación**

### **5.1. Métodos de conservación corneal**

Los métodos de conservación corneal más utilizados en la actualidad pueden ser divididos, a grandes rasgos, en tres grupos: conservación en **fresco, hipotermia y cultivo de órganos.**<sup>32,54,55</sup> Un cuarto método, utilizado sobretudo en oftalmología veterinaria y experimentalmente en oftalmología humana, es la **criopreservación a -20°C**. Este último es, desde el punto de vista económico, el método de conservación más asequible para la mayoría de **oftalmólogos veterinarios**.

Las diferencias principales entre los actuales métodos de conservación corneal radican en el **tiempo de mantenimiento de la viabilidad celular y de la estructura de colágeno**. Los injertos corneales frescos, en hipotermia o en cultivo, mantienen las células endoteliales vivas y su viabilidad sigue siendo alta después del trasplante; mientras que en los tejidos **congelados a -20°C** las células endoteliales y epiteliales mueren, siendo considerado el tejido trasplantado meramente una matriz de colágeno.

La viabilidad endotelial desaconseja realizar injertos heterólogos frescos, por el elevado riesgo de rechazo, pero defiende la realización de injertos heterólogos congelados, en los que, por el contrario, la actividad antigénica es muy reducida.

#### ***5.1.1. Conservación corneal en fresco***

Para la conservación en **fresco** o en **cámara húmeda** se obtiene un anillo corneoescleral, que se mantiene en condiciones específicas de humedad y refrigeración. Con este método se puede utilizar la córnea durante 1 o 2 días, con muy buenos resultados. Sin embargo, aspectos como la contaminación microbiana y transmisión de enfermedades hacen que este método se haya reemplazado casi por completo por la hipotermia y el cultivo de órganos.<sup>13</sup>

#### ***5.1.2. Conservación corneal mediante hipotermia***

El método de conservación **hipotérmico** fue desarrollado por McCarey y Kaufman en 1974, utilizando un medio de cultivo estándar (TC-199) suplementado con antibióticos y dextrano como anticongelante. A pesar de que, debido a las bajas temperaturas (4°C), el metabolismo de la córnea se reduce al mínimo, se mantiene la viabilidad del tejido durante **una semana**.<sup>56</sup> Éste método de conservación -que conserva, al igual que el anterior, únicamente el anillo corneoescleral- es el método más utilizado actualmente en los bancos de ojos de los Estados Unidos de América.<sup>13</sup>

### 5.1.3. Conservación corneal en cultivo de órganos

El **cultivo de órganos** fue introducido en los 70s por el Dr. Sperling.<sup>57</sup> Para éste método también se obtiene un anillo corneoescleral que se conserva a **37°C**. Se basa en la idea de mantener el tejido aislado bajo **condiciones fisiológicas simuladas** durante el mayor tiempo posible (**30-40 días**).<sup>58</sup> Las ventajas de este método incluyen poder comprobar la viabilidad y la esterilidad del tejido antes de realizar el trasplante. En estos momentos es el método de conservación de elección en Europa occidental.<sup>13</sup>

### 5.1.4. Criopreservación del tejido corneal

La **criopreservación** de tejido corneal es una técnica que, en comparación con las anteriormente descritas, permite prolongar significativamente el tiempo de almacenamiento del tejido, pero a su vez reduce de forma marcada la supervivencia de las células endoteliales (<2000 cél/mm<sup>2</sup>) y epiteliales.<sup>59-63</sup> Esta reducción ha sido motivo de investigación durante los últimos años, probando diversos crioprotectores (dimetilsulfóxido, dextrano o glicerol)<sup>64-67</sup> y diferentes protocolos de congelación y descongelación.<sup>68,69</sup> Desafortunadamente, los crioprotectores no han garantizado, hasta la fecha, la función endotelial después del trasplante, siendo la **apoptosis** la mayor causa de muerte endotelial documentada en oftalmología humana.<sup>70</sup>

Los estudios realizados hasta la fecha en trasplantes de córnea criopreservados a -20°C, han demostrado **resultados postquirúrgicos favorables**, siendo las complicaciones más documentadas el edema y rechazo del injerto, la formación de tejido de granulación y la dehiscencia de

la sutura.<sup>24,26,27,31,32,41,52,68,69</sup> Cabe destacar que éstas complicaciones no son exclusivas de las queratoplastias, pudiéndose observar en otras técnicas de reconstrucción corneal.

## 5.2. Métodos de conservación escleral

En los trasplantes esclerales la viabilidad de las células donantes no es vital para el resultado de la cirugía, por lo que se utilizan otros métodos de conservación, entre ellos la **conservación en etanol** y la **conservación en seco**.<sup>50</sup>

### 5.2.1. Conservación en etanol

La conservación del tejido escleral en **etanol** es un método muy sencillo de realizar. El tejido se libera del resto de estructuras oculares, se sumerge en etanol al 90% y se mantiene a **4-8°C** durante **largos periodos de tiempo** (Fig. 8).<sup>50</sup>



**Figura 8:** Conservación escleral en etanol.  
(Fuente: [www.sahiyaraeyebank.com/sclera-transplant.html](http://www.sahiyaraeyebank.com/sclera-transplant.html))

### 5.2.2. Conservación en seco

La conservación en **seco** es el método más utilizado para la conservación de tejido escleral. El tejido se libera del resto de estructuras oculares y se sumerge en etanol al 70% durante 5 horas, seguido de 24 horas en etanol al 96%. Pasado este tiempo, la esclera se limpia con solución salina isotónica, para finalmente secarse utilizando una fuente de calor y refrigerarse en un tubo estéril. El tejido conservado en seco puede mantenerse aproximadamente durante **un año** (Fig. 9).<sup>50</sup>



**Figura 9:** Conservación escleral en seco.  
(Fuente: [www.rtx.com/implants/surgical-specialties/sclera](http://www.rtx.com/implants/surgical-specialties/sclera))

## 6. Muerte celular

La muerte celular tiene lugar durante el proceso de conservación previo al trasplante y acontece por dos posibles vías: **apoptosis** y **necrosis**. La **apoptosis** es la **vía principal** de muerte de las células endoteliales y queratocitos durante el proceso de conservación.<sup>70,72,73</sup> Se trata de un proceso activo de destrucción celular, no asociado a inflamación, caracterizado por contracción y agregación de la cromatina, pero que preserva la membrana celular y las mitocondrias.<sup>74</sup>

En comparación, la **necrosis** es un proceso pasivo de inflamación que lesiona gravemente las mitocondrias, produciendo pérdida rápida de energía y disrupción generalizada de la homeostasis interna. Este proceso, a diferencia de la apoptosis, sí que produce reacción e inflamación del tejido colindante.<sup>74</sup>

---

# *Hipótesis*

---

### **1. Hipótesis principal**

- La crioconservación (-20°C) de tejido corneoescleral durante un largo periodo de tiempo es segura, tanto desde el punto de vista estructural como microbiológico, en las especies canina, felina y equina.

### **2. Hipótesis secundarias**

- El proceso de muerte celular durante la crioconservación (-20°C), en las especies canina, felina y equina, se produce en su mayoría mediante apoptosis.
- La microestructura del colágeno corneoescleral criocongelado (-20°C) se preserva durante largos periodos de tiempo, en las especies canina, felina y equina.
- La carga bacteriana del tejido corneoescleral crioconservado (-20°C) disminuye con el paso del tiempo, en las especies canina, felina y equina.

---

# *Objetivos*

---

### **1. Objetivo principal**

- Demostrar la viabilidad estructural y microbiológica de tejido corneoescleral crioconservado (-20°C) durante un largo periodo de tiempo, en las especies canina, felina y equina.

### **2. Objetivos secundarios**

- Determinar el proceso de muerte celular mayoritario del tejido corneal crioconservado (-20°C) mediante dos técnicas: microscopía electrónica de transmisión en las especies canina, felina y equina; y mediante TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) en la especie canina.
- Demostrar la conservación de la microestructura del colágeno corneoescleral criocongelado (-20°C) mediante microscopía electrónica de transmisión en las especies canina, felina y equina.
- Demostrar que la carga bacteriana del tejido corneoescleral crioconservado (-20°C) disminuye con el tiempo en las especies canina, felina y equina.

---

## *Material y métodos*

---

### **1. Instalaciones**

La parte experimental de la presente tesis doctoral se llevó a cabo en diferentes instalaciones: Fundació Hospital Clínic Veterinari de la Universitat Autònoma de Barcelona (FHCV-UAB), quirófanos experimentales de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), laboratoris UNIVET, laboratoris Histovet, Unitat de Fisiologia Veterinària de la UAB y Servei de Microscopia Electrònica de la UAB.

### **2. Animales**

Se incluyen en la presente tesis doctoral los globos oculares de aquellos pacientes caninos, felinos y equinos, que murieron o fueron eutanasiados en la FHCV-UAB, durante el periodo de tiempo comprendido entre Enero del 2003 y Diciembre del 2013. Los ojos fueron legalmente donados a la ciencia por los propietarios de los animales mediante la firma de un consentimiento informado.

En todos los individuos se evaluaron tanto la reseña como el historial clínico, y se realizó exploración oftalmológica básica (antemortem o inmediatamente tras la eutanasia), mediante lámpara de hendidura (Kowa SL-14, Kowa Company, Tokyo, Japan) y oftalmoscopia indirecta (Heine Omega 180, Herrsching, Germany). Únicamente se incluyeron en el estudio globos oculares sin alteraciones oftalmológicas que proviniesen de animales sin enfermedades infecciosas o tumorales diagnosticadas antemortem. Los animales sin diagnóstico antemortem o diagnóstico dudoso, fueron excluidos del estudio.

### 3. Recogida y almacenamiento de los globos oculares

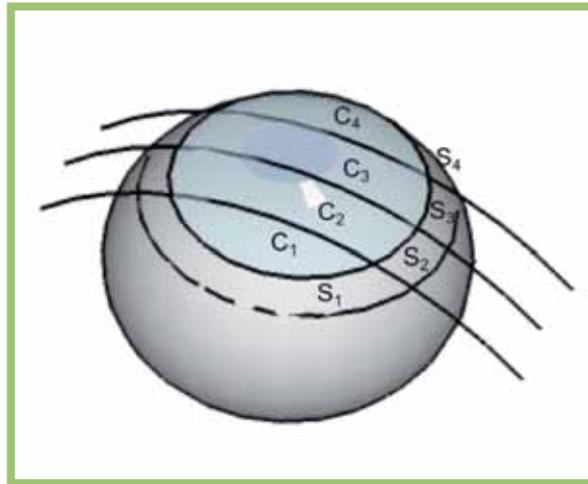
La recogida de los globos oculares se realizó en todos los casos en un periodo inferior a 10 horas postmortem, tiempo durante el que los cadáveres se mantuvieron refrigerados (4-6°C). La enucleación se llevó a cabo previo protocolo de descontaminación que incluyó 3 lavados de la superficie ocular y anejos oculares, alternando una dilución de povidona-iodada al 5% y suero salino fisiológico estéril.<sup>75</sup> Seguidamente, se realizó enucleación transconjuntival, depositando los globos oculares en contenedores estériles con base de gasas estériles. Finalmente, se aplicó una solución de trimetoprim y polimixina B comercializada para uso oftalmológico (Oftalmotrim<sup>®</sup>, Alcon Cusí S.A., El Masnou, Barcelona), sobre el globo ocular y el contenedor se crioconservó a -20°C, debidamente identificado (Fig. 10). Los ojos se mantuvieron en congelación hasta el momento del procesamiento.



**Figura 10:** Posición del globo ocular para crioconservación a -20°C en un recipiente estéril.

#### 4. Clasificación y procesado de las muestras

Los globos oculares de cada una de las especies incluidas en el estudio se clasificaron en 3 grupos: **grupo control** (GC; procesados inmediatamente después de la enucleación), grupo de **tejidos crioconservados a -20°C durante un periodo de tiempo  $\leq 1$  año** ( $G \leq 1a$ ) y grupo de **tejidos crioconservados a -20°C durante un periodo de tiempo  $\geq 6$  años** ( $G \geq 6a$ ). Los tres grupos se procesaron siguiendo el mismo protocolo, pero en periodos de tiempo diferentes. Los globos oculares crioconservados ( $G \leq 1a$  y  $G \geq 6a$ ) se procesaron inmediatamente después de su extracción del congelador, y los globos oculares control inmediatamente después de la enucleación. Las muestras de los tres grupos se procesaron bajo campana de flujo laminar (Telstar MH-100, Telstar S.A., Terrassa, Barcelona) y en condiciones de esterilidad. Se eliminó la conjuntiva remanente y se realizó una incisión escleral circular a 10 mm de distancia del limbo corneoescleral, mediante bisturí de Beaver nº65 y tijera de Stevens. Los anillos corneoesclerales obtenidos se dividieron en 8 secciones (4 corneales y 4 esclerales) (Fig.11). Dos secciones de cada tejido se usaron para el análisis microbiológico, una sección para el examen histológico y la última para microscopia electrónica de transmisión (MET). En la especie canina, las muestras corneales reservadas para el estudio histológico se utilizaron también para valorar la muerte celular de los queratocitos mediante “*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*” (TUNEL).



**Figura 11:** Distribución de las secciones realizadas. Las muestras corneales (C) y esclerales (S) se procesaron de la siguiente manera: C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>: Microbiología; C<sub>2</sub>, S<sub>4</sub>: Histología; y C<sub>3</sub>, S<sub>1</sub>: Microscopio electrónico de transmisión y TUNEL.

#### 4.1. Análisis microbiológico

Las muestras destinadas al estudio microbiológico (2 corneales y 2 esclerales) se procesaron bajo campana de flujo laminar. Una sección de cada tejido se sembró directamente en agar sangre (AS), agar McConkey (AMC) y agar Sabouraud (ASab). Los medios de cultivo se mantuvieron a 37°C en condiciones aerobias y se obtuvieron los resultados en 24 horas. La segunda sección de cada tejido se sembró en caldo de cultivo de infusión cerebro-sangre, donde se mantuvo a 37°C en condiciones aerobias durante 24 horas. Tras detectar turbidez en el medio, éste se sembró en AS y AMC, manteniéndose 24 horas a 37°C.<sup>76-79</sup>

Tras el tiempo preestablecido de incubación, se identificaron las colonias resultantes mediante tinciones de Gram, test de la oxidasa y tests API®. Para la identificación de los *Staphylococcus* se utilizó la galería API ID32 STAPH, para las enterobacterias la API 20E, y para las no-enterobacterias la API 20NE (Biomérieux Corporate, Marcy l'Etoile, France) (Fig.12).<sup>78</sup>



**Figura 12:** Ejemplo de test de API® realizado para identificar los microorganismos.

#### **4.2. Estudio histológico**

Las secciones corneales y esclerales seleccionadas para realizar histología se fijaron en formaldehído al 10% inmediatamente tras su descongelación, se procesaron de manera convencional y se tiñeron con hematoxilina-eosina.<sup>60,62,80</sup> Mediante microscopía óptica se evaluó la cantidad de burbujas producidas por la crioconservación en córnea y esclera [0 (ausencia de burbujas) y 4+ (máxima presencia de burbujas)], y su localización en el espesor corneal (estroma superficial, medio, profundo o espesor completo).

### **4.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Las secciones corneales y esclerales seleccionadas para realizar MET se fijaron en solución Karnowski (glutaraldehído 2,5%, paraformaldehído 2% y tampón fosfato 0,1M). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. El tejido se procesó de forma convencional. Finalmente, córnea y esclera se evaluaron bajo el microscopio de transmisión electrónica. Se valoró la estructura del colágeno de ambos tejidos (córnea y esclera), así como la morfología de los queratocitos. Para ello, se seleccionaron de forma aleatoria 10 áreas de tejido corneal y, a 5.000 aumentos, se cuantificaron los queratocitos y se valoró la organización del colágeno (organizado, semiorganizado y desorganizado). Seguidamente, los queratocitos ubicados a 5.000 aumentos, se estudiaron a 30.000 aumentos y se clasificaron según su aspecto ultraestructural en normales, apoptóticos o necróticos.<sup>54,62</sup>

Para el estudio del colágeno escleral se seleccionaron de forma aleatoria 5 áreas de tejido y, a 5.000 aumentos, se valoró la organización del colágeno clasificándose como organizado, semiorganizado y desorganizado.

### **4.4. TUNEL**

La determinación de la muerte celular de los queratocitos en la especie canina se completó con el “*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*” (TUNEL), método que detecta apoptosis marcando la fragmentación del ADN producida por este proceso.

Los bloques preparados para el estudio histológico fueron desparafinados calentándolos a 60°C durante 20 minutos, para seguidamente rehidratarlos siguiendo un gradiente de alcoholes decrecientes e incubarlos con 0,1M de tampón citrato a pH 6. Para ello, las preparaciones se pusieron en un contenedor de plástico con 200 ml de tampón citrato y se calentó en el microondas a 350W durante 5 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS.

La mezcla de reacción se preparó siguiendo las instrucciones y los reactivos suministrados en un kit comercial (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Sant Cugat del Vallès, Barcelona). Se incluyó control negativo, incubando el tejido con 50µl del reactivo "Label Solution" del mismo kit, a 37°C durante 60 minutos, y control positivo, incubándose el tejido con "DNase I recombinant", proporcionada en el mismo kit, a 25°C durante 10 minutos. Para el estudio de las muestras problema, se añadieron 50µl de la mezcla de reacción y se incubó la muestra en oscuridad, y en atmosfera húmeda de 37°C, durante 60 minutos.

Se realizaron 3 lavados con PBS. Seguidamente, todos los portaobjetos (controles y muestras problema) se montaron con solución DAPI y se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de 515-565nm. Se fotografiaron 20 campos por muestra a 40 aumentos, y se contabilizaron los núcleos totales (marcados con DAPI) y los apoptóticos (marcados con TUNEL).

### ***5. Estudio estadístico***

Para el análisis estadístico las muestras se dividieron en dos periodos de conservación, las que habían estado a -20°C durante menos de un año ( $\leq 1a$ ) y las que habían estado más de 6 años ( $\geq 6a$ ).

Los resultados se describieron como mediana y rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para las variables continuas. Las variables categóricas se describieron como frecuencia absoluta y relativa. Las comparaciones con variables independientes continuas u ordinales, como los resultados histológicos, se realizaron mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney, mientras que la evaluación de las variables nominales, como los resultados de los cultivos, se realizó empleando la prueba Exacta de Fisher. En todos los casos se ha utilizado un Error de Tipo I bilateral del 5% y para el análisis de los resultados se ha empleado el programa estadístico SPSS ver.20.

---

# *Resultados*

---

## 1. Especie canina

Durante el periodo de tiempo que duró el estudio, se obtuvieron **36 globos oculares de 22 perros** de diversas razas, sexo y edad (1-17 años). Estos ojos se clasificaron en **GC** (n=4), **G<sub>≤1a</sub>** [n=20] y **G<sub>≥6a</sub>** [n=12]. En el **G<sub>≤1a</sub>**, los ojos se procesaron en grupos de 4 unidades, tras 1, 3, 6, 9 y 12 meses de criopreservación (T<sub>1m</sub>, T<sub>3m</sub>, T<sub>6m</sub>, T<sub>9m</sub>, T<sub>1a</sub>, respectivamente). De forma similar, en el **G<sub>≥6a</sub>** se procesaron los ojos también en grupos de 4, pero a los 6, 7 y 8 años de criopreservación (T<sub>6a</sub>, T<sub>7a</sub>, T<sub>8a</sub>, respectivamente).

### 1.1. Resultados microbiológicos

#### 1.1.1. Resultado microbiológico del tejido canino corneal criocongelado

El estudio microbiológico del **GC** descartó crecimiento bacteriano o fúngico. En los cultivos directos de las muestras crioconservadas, únicamente se detectó crecimiento en las muestras del **G<sub>≤1a</sub>** (5/20;25%), siendo las del **G<sub>≥6a</sub>** negativas (0/12;0%) (p=0,130). Por otro lado, en los cultivos enriquecidos se observó crecimiento en ambos grupos, aunque mayor en **G<sub>≤1a</sub>** (9/20;47,4%) que en **G<sub>≥6a</sub>** (2/12;16,7%) (p=0,128) (Tabla 2).

Los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *Staphylococcus pseudintermedius* (n=3) y *S. xylosus* (n=3) seguidos de *S. epidermidis* (n=2) (Tabla 3).

**Tabla 2:** Resultados estadísticos de la microbiología de la córnea en la especie canina. ASD: Agar Sangre cultivo directo. AMcD: Agar McConkey cultivo directo. ASabD: Agar Sabouraud cultivo directo. TE: Turbidez enriquecimiento. ASE: Agar Sangre enriquecimiento. AMcE: Agar McConkey enriquecimiento. El p-valor indica la comparación estadística entre ambos grupos cuando se puede aplicar.

Cultivo	Resultado	Total (n=32)	≤ 1 año (n=20)	≥ 6 años (n=12)	p-valor
ASD	-	27 (84,4%)	15 (75%)	12 (100%)	0,130
	+	5 (15,6%)	5 (25%)	0 (0%)	
AMcD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
ASabD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Total					
TE	-	23 (71,9%)	13 (65%)	10 (83,3%)	0,422
	+	9 (28,1%)	7 (35%)	2 (16,7%)	
ASE	-	20 (64,5%)	11 (52,6%)	10 (83,3%)	0,128
	+	12 (35,5%)	9 (47,4%)	2 (16,7%)	
AMcE	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

**Tabla 3:** Microorganismos identificados y número de aislamientos en córneas de la especie canina por grupo.

Grupo	Microorganismo	Número de aislamientos
≤1 año (n=9)	<i>Staph. pseudintermedius</i>	3
	<i>Staph. xylosus</i>	3
	<i>Staph. epidermidis</i>	2
	<i>Bacillus cereus</i>	1
≥6 años (n=2)	<i>Bacillus spp.</i>	1
	<i>Streptococcus spp.</i>	1

### 1.1.2. Resultado microbiológico del tejido canino escleral criocongelado

El estudio microbiológico del **GC** mostró positividad en dos cultivos de esclera enriquecidos (50%;2/4), siendo *Staphylococcus spp.* el microorganismo aislado en ambos casos (Tabla 4). En los cultivos directos de las muestras crioconservadas, únicamente se detectó crecimiento en las muestras del **G≤1a** (6/20;30%), siendo las del **G≥6a**, negativas (0/12;0%) (p=0,061).

Por otro lado, en los cultivos enriquecidos se observó crecimiento en ambos grupos aunque mayor en **G<sub>≤1a</sub>** (13/20; 66,7%) que en **G<sub>≥6a</sub>** (2/12; 16,7%) ( $p=0,011$ ) (Tabla 5)

El microorganismo más aislado fue *Staphylococcus pseudintermedius* (n=7) seguido por *Streptococcus alpha hemolítico* (n=2) (Tabla 4).

**Tabla 4:** Microorganismos identificados y número de aislamientos en esclera de la especie canina por grupo.

Grupo	Microorganismo	Número de aislamientos
≤1 año (n=15)	<i>Staph. pseudintermedius</i>	7
	<i>Strep. alpha hemolítico</i>	2
	<i>Bacilo gram +</i>	1
	<i>Staph. epidermidis</i>	1
	<i>Staph. xylosus</i>	1
	<i>Pseudomonas spp.</i>	1
	<i>Clostridium spp.</i>	1
	<i>Bacillus cereus</i>	1
≥6 años (n=2)	<i>Bacillus spp.</i>	1
	<i>Bacillus circulans</i>	1
Control (n=2)	<i>Staph. pseudointermedius</i>	1
	<i>Staphylococcus spp.</i>	1

**Tabla 5:** Resultados estadísticos de la microbiología de la esclera en la especie canina. ASD: Agar Sangre cultivo directo. AMcD: Agar McConkey cultivo directo. ASabD: Agar Sabouraud cultivo directo. TE: Turbidez enriquecimiento. ASE: Agar Sangre enriquecimiento. AMcE: Agar McConkey enriquecimiento. El p-valor indica la comparación estadística entre ambos grupos cuando se puede aplicar.

Cultivo	Resultado	Total (n=32)	≤ 1 año (n=20)	≥ 6 años (n=12)	p-valor
ASD	-	26 (81,2%)	14 (70%)	12 (100%)	0,061
	+	6 (18,8%)	6 (30%)	0 (0%)	
AMcD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
ASabD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
TE	-	18 (56,2%)	8 (40%)	10 (83,3%)	0,028
	+	14 (43,8%)	12 (60%)	2 (16,7%)	
ASE	-	17 (53,3%)	7 (33,3%)	10 (83,3%)	0,011
	+	15 (46,7%)	13 (66,7%)	2 (16,7%)	
AMcE	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

## 1.2 Resultados histológicos

### 1.2.1 Resultados histológicos del tejido canino corneal criocongelado

En el **GC** se detectaron burbujas de crioconservación en 3 ojos (75%;3/4), siendo de grado leve (1+) en uno, y moderado (2+) en el resto. Las córneas **G $\leq$ 1a** mostraron artefactos leves de criocongelación en el 95% de los casos (19/20), mientras que las **G $\geq$ 6a** mostraron grados de moderados a marcados (2+/3+/4+) en un 91,7% de los casos (11/12). Los artefactos secundarios a la crioconservación fueron significativamente más evidentes en **G $\geq$ 6a** que en **G $\leq$ 1a** ( $p < 0,001$ ).

La profundidad de los artefactos (Fig.13) queda resumida en la Tabla 6. Tal y como muestra la tabla, en las muestras **G $\leq$ 1a** los artefactos se localizaron principalmente, de forma parcial, en algunas de las capas del estroma, estando ubicadas en todo el estroma únicamente en 3 casos (25%;3/12). Por el contrario, el 50% de las muestras **G $\geq$ 6a** (6/12) mostraron burbujas en todo el espesor estromal.

**Tabla 6:** Resultados estadísticos histológicos en córnea de la especie canina. 0 = ausencia de artefactos. 4+ = cantidad máxima de artefactos.

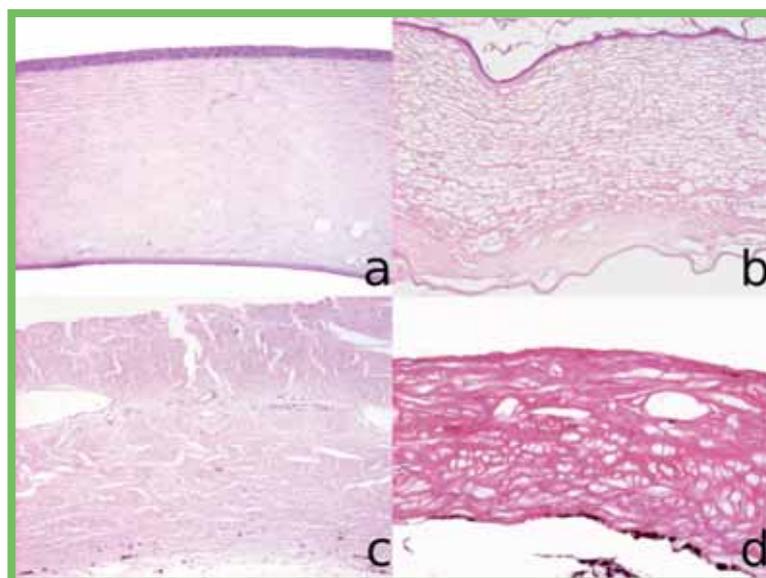
<b>Artefactos</b>	<b>Total (n=32)</b>	<b><math>\leq 1</math> año (n=20)</b>	<b><math>\geq 6</math> años (n=12)</b>	<b>p-valor</b>
0	8 (25%)	8 (40%)	0 (0%)	< 0,001
1+	9 (28,1%)	8 (40%)	1 (8,3%)	
2+	5 (15,6%)	3 (15%)	2 (16,7%)	
3+	6 (18,8%)	1 (5%)	5 (41,7%)	
4+	4 (12,5%)	0 (0%)	4 (33,3%)	
<b>Localización de los artefactos</b>				
Estroma Anterior	7 (29,2%)	4 (33,3%)	3 (25%)	0,593
Estroma Anterior y Medio	4 (16,7%)	3 (25%)	1 (8,3%)	
Estroma Anterior y Profundo	3 (12,5%)	1 (8,3%)	2 (16,7%)	
Estroma Profundo	1 (8,3%)	1 (8,3%)	0 (0%)	
Espesor Completo	9 (37,5%)	3 (25%)	6 (50%)	

### 1.2.2 Resultados histológicos del tejido canino escleral criocongelado

Al igual que en el tejido corneal control, el **GC** escleral mostró burbujas de crioconservación en 3 ojos (75%;3/4), siendo, en este caso de grado leve (1+). Todas las muestras esclerales conservadas **G≥6a** (100%;12/12) mostraron artefactos de grados moderado a severo (2+, 3+ ó 4+), mientras que en muestras más recientes (**G≤1a**;n=20), únicamente se observaron grados de artefactos comprendidos entre 0, 1+ y 2+. Al igual que en el tejido corneal, los artefactos secundarios a la crioconservación fueron significativamente más evidentes en **G≥6a** que en **G≤1a** ( $p<0,001$ ) (Tabla 7; Fig.13).

**Tabla 7:** Resultados estadísticos histológicos en esclera de la especie canina. 0 = ausencia de artefactos. 4+ = cantidad máxima de artefactos.

Artefactos	Total (n=32)	≤ 1 año (n=20)	≥ 6 años (n=12)	p-valor
0	3 (9,4%)	3 (15%)	0 (0%)	<0,001
1+	12 (37,5%)	12 (60%)	0 (0%)	
2+	7 (21,9%)	5 (25%)	2 (16,7%)	
3+	2 (6,2%)	0 (0%)	2 (16,7%)	
4+	8 (25%)	0 (0%)	8 (66,7%)	



**Figura 13:** Imagen histológica a 4x de los artefactos (burbujas) corneales y esclerales en el perro. **a:** Córnea normal. **b:** Córnea con artefactos 4+. **c:** Esclera normal. **d:** Esclera con artefactos 4+.

### **1.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

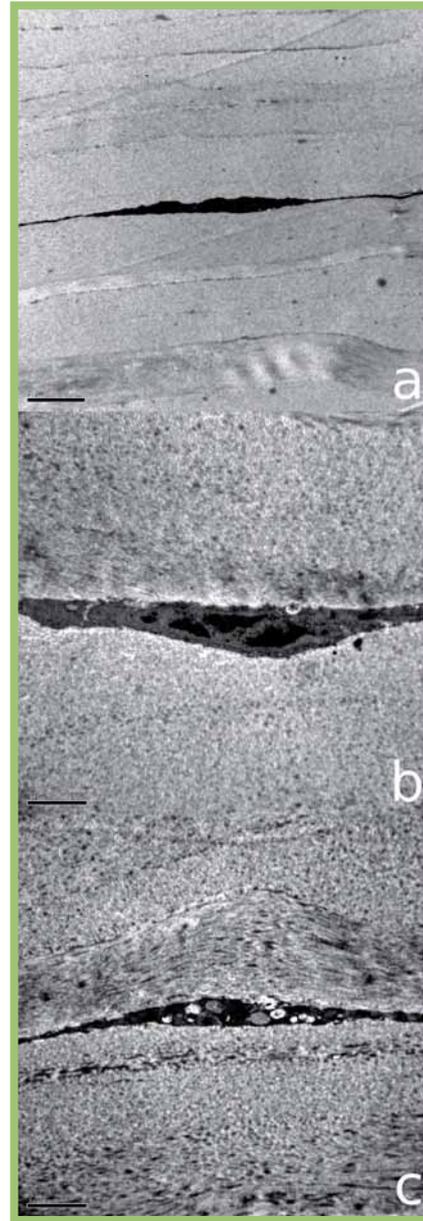
#### **1.3.1. MET en tejido canino corneal criocongelado**

Las muestras control evidenciaron colágeno organizado en todos los casos. El colágeno se clasificó mayoritariamente como organizado en ambos grupos de conservación corneal [(85% para **G<sub>≤1a</sub>**;17/20) y (50% para **G<sub>≥6a</sub>**; 6/12)]. Solo una muestra del **G<sub>≥6a</sub>** fue clasificada como desorganizada (8,3%;1/12) (Tabla 8;Fig.14). Las diferencias de clasificación entre ambos grupos fueron consideradas como estadísticamente significativas ( $p=0,037$ ).

Los queratocitos de las muestras control fueron clasificados como normales. Los queratocitos de las muestras **G<sub>≤1a</sub>** se clasificaron como apoptóticos en su mayoría (95%;19/20) y el resto como necróticos (5%;1/20); al igual que los de las muestras **G<sub>≥6a</sub>** [apoptóticos (91,7%;11/12) y necróticos (8,3%;1/12)] (Tabla 8; Fig. 15).



**Figura 14:** Imagen de la organización del colágeno corneal del perro obtenida a 5.000x mediante microscopía electrónica de transmisión **a:** Normal. **b:** Semiorganizada. **c:** Desorganizada.



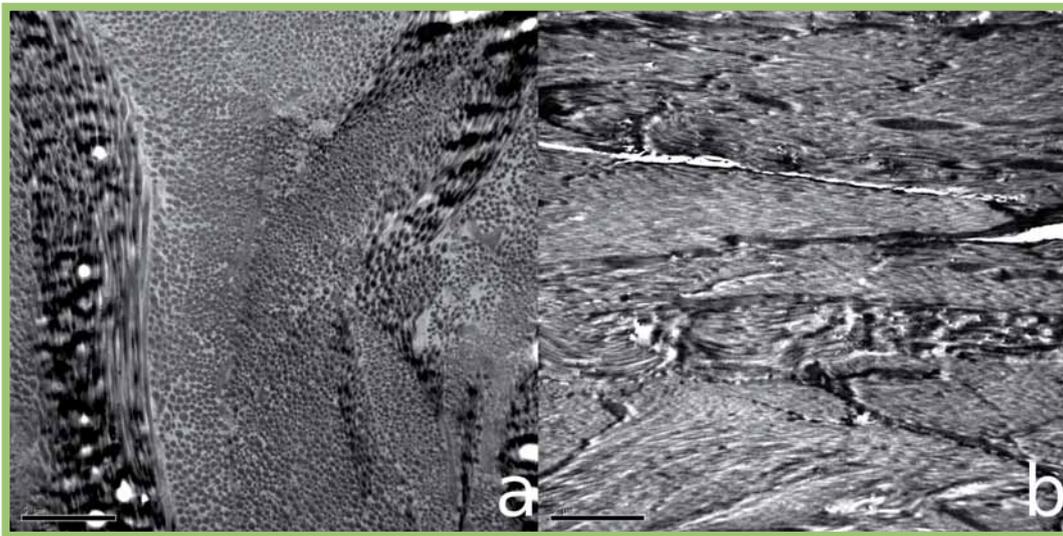
**Figura 15:** Imagen de los queratocitos del perro obtenida a 30.000x mediante microscopía electrónica de transmisión **a:** Queratocito normal. **b:** Queratocito apoptótico 4+. **c:** Queratocito necrótico.

**Tabla 8:** Resultados estadísticos de microscopía electrónica de transmisión para la córnea en la especie canina.

<b>Estructura del colágeno</b>	<b>Total (n=32)</b>	<b>≤ 1 año (n=20)</b>	<b>≥ 6 años (n=12)</b>	<b>p-valor</b>
Organizado	23 (71,9%)	17 (85,0%)	6 (50,0%)	0,037
Semiorganizado	8 (25,0%)	3 (15,0%)	5 (41,7%)	
Desorganizado	1 (3,1%)	0 (0%)	1 (8,3%)	
<b>Queratocitos</b>				
Normales	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,000
Apoptóticos	30 (93,8%)	19 (95%)	11 (91,7%)	
Necróticos	2 (6,2%)	1 (5%)	1 (8,3%)	

### 1.3.2. MET en tejido canino escleral criocongelado

Las muestras control evidenciaron colágeno organizado en todos los casos. En el **G<sub>≤1a</sub>** las muestras se clasificaron mayoritariamente como organizadas (75%;15/20) y en el **G<sub>≥6a</sub>** como semiorganizadas (66,7%;8/12) (Tabla 9; Fig.16), siendo la diferencia en clasificación estadísticamente significativa ( $p=0,03$ ).



**Figura 16:** Imagen de la organización del colágeno escleral del perro a 5.000x obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión **a:** Normal. **b:** Semiorganizada.

**Tabla 9:** Resultados estadísticos de microscopía electrónica de transmisión para la esclera en la especie canina.

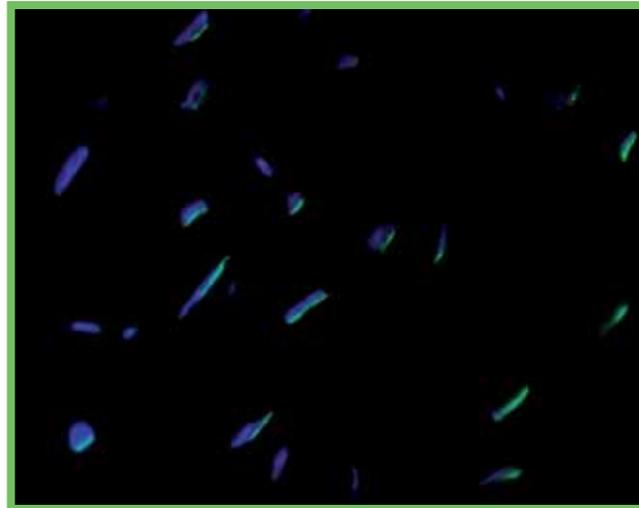
<b>Estructura del colágeno</b>	<b>Total (n=32)</b>	<b>≤ 1 año (n=20)</b>	<b>≥ 6 años (n=12)</b>	<b>p-valor</b>
Organizado	19 (59,4%)	15 (75,0%)	4 (33,3%)	0,030
Semiorganizado	13 (40,6%)	5 (25,0%)	8 (66,7%)	
Desorganizado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

### 1.4 TUNEL

Se realizó TUNEL en 22 córneas caninas, en las que se clasificaron como apoptóticos el 87% de los queratocitos observados en el **G $\leq$ 1a** y el 85% de los queratocitos observados en el **G $\geq$ 6a**. No se encontraron diferencias significativas entre periodos ( $p=0,797$ ) (Tabla 10; Fig.17).

**Tabla 10:** Resultados del TUNEL en queratocitos de córnea criocongelada de la especie canina.

	<b>Total</b>	<b><math>\leq 1</math> año</b>	<b><math>\geq 6</math> años</b>	<b>p-valor</b>
Apoptosis	86%	87%	85%	0,797



**Figura 17:** Imagen a 40x en microscopio de fluorescencia en la que se aprecia proporción de queratocitos apoptóticos (verde) frente al total (azul).

## 2. Especie felina

Durante el periodo de tiempo que duró el estudio, se obtuvieron **20 globos oculares de 10 gatos**, de diferente raza y sexo, y de edades comprendidas entre los 4 y 18 años. Estos ojos se clasificaron en **GC** (n=2), **G $\leq$ 1a** (n=10) y **G $\geq$ 6a** (n=8). En el **G $\leq$ 1a**, los ojos se procesaron en grupos de 2 unidades, tras 1, 3, 6, 9 y 12 meses de criopreservación (T<sub>1m</sub>, T<sub>3m</sub>, T<sub>6m</sub>, T<sub>9m</sub>, T<sub>1a</sub>, respectivamente). En el **G $\geq$ 6a** se procesó un ojo a los 7 años (T<sub>7a</sub>) y 7 ojos a los 10 años (T<sub>10a</sub>).

### 2.1. Resultados microbiológicos

#### 2.1.1. Resultado microbiológico del tejido felino corneal criopreservado

El estudio microbiológico el **GC** mostró crecimiento únicamente en un cultivo enriquecido de córnea (50%;1/2), siendo *Bacillus spp.* el agente aislado. (Tabla 11). En el **G $\leq$ 1a** se observó crecimiento directo en 1 muestra (10%;1/10) y crecimiento en 3 muestras enriquecidas (30%;3/10); mientras que en el **G $\geq$ 6a** no se observó crecimiento en las siembras directas ni en las enriquecidas (0%;0/12) (Tabla 12). El microorganismo aislado en los cultivos de córnea felina fue *Staphylococcus spp* (n=2; *S. xylosum* (n=1) y *S.coagulans* negativo (n=1)), y *Clostridium spp.* (n=1) (Tabla 11).

**Tabla 11:** Microorganismos identificados y número de aislamientos en córneas de la especie felina por grupo.

Grupo	Microorganismo	Número de aislamientos
≤1 año (n=3)	<i>Staph. simulans</i>	1
	<i>Clostridium spp.</i>	1
	<i>Staph. coagulasa</i> -	1
Control (n=1)	<i>Bacillus spp.</i>	1

**Tabla 12:** Resultados estadísticos de la microbiología de la córnea en la especie felina. ASD: Agar Sangre cultivo directo. AMcD: Agar McConkey cultivo directo. ASabD: Agar Sabouraud cultivo directo. TE: Turbidez enriquecimiento. ASE: Agar Sangre enriquecimiento. AMcE: Agar McConkey enriquecimiento. El p-valor indica la comparación estadística entre ambos grupos cuando se puede aplicar.

Cultivo	Resultado	Total (n=18)	≤ 1 año (n=10)	≥ 6 años (n=8)	p-valor
ASD	-	17 (94,4%)	9 (90%)	8 (100%)	1.000
	+	1 (5,6%)	1 (10%)	0 (0%)	
AMcD	-	18 (100%)	10 (100%)	8 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
ASabD	-	18 (100%)	10 (100%)	8 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
TE	-	15 (83,3%)	7 (70%)	8 (100%)	0.216
	+	3 (16,7%)	3 (30%)	0 (0%)	
ASE	-	15 (83,3%)	7 (70%)	8 (100%)	0.216
	+	3 (16,7%)	3 (30%)	0 (0%)	
AMcE	-	18 (100%)	10 (100%)	8 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

### 2.1.2. Resultado microbiológico del tejido felino escleral criocongelado

El estudio microbiológico del **GC** mostró crecimiento en todos los cultivos directos y enriquecidos de esclera (100%;2/2) (Tabla 13). En el **G≤1a** se observó crecimiento directo en 2 muestras (20%;2/10) y crecimiento en 3 muestras enriquecidas (30%;3/10); mientras que en el **G≥6a** no se observó crecimiento en las siembras directas ni en las enriquecidas (0%;0/12) (Tabla 14). Los microorganismos aislados en los cultivos de esclera crioconservadas de gatos fueron *Staphylococcus spp* (n=2; *S. simulans* (n=1), y *S.coagulasa negativo* (n=1)) y *Clostridium spp.* (n=1) (Tabla 13).

**Tabla 13:** Microorganismos identificados y número de aislamientos en esclera de la especie felina por grupo.

Grupo	Microorganismo	Número de aislamientos
≤1 año (n=3)	<i>Staph. simulans</i>	1
	<i>Clostridium spp.</i>	1
	<i>Staph. coagulasa</i> -	1
Control (n=2)	<i>Staph. simulans</i>	1
	<i>Staph. xylosus</i>	1

**Tabla 14:** Resultados estadísticos de la microbiología de la esclera en la especie felina. ASD: Agar Sangre cultivo directo. AMcD: Agar McConkey cultivo directo. ASabD: Agar Sabouraud cultivo directo. TE: Turbidez enriquecimiento. ASE: Agar Sangre enriquecimiento. AMcE: Agar McConkey enriquecimiento. El p-valor indica la comparación estadística entre ambos grupos cuando se puede aplicar.

Cultivo	Resultado	Total (n=18)	≤ 1 año (n=10)	≥ 6 años (n=8)	p-valor
ASD	-	16 (88,9%)	8 (80%)	8 (100%)	0,477
	+	2 (11,1%)	2 (20%)	0 (0%)	
AMcD	-	18 (100%)	10 (100%)	8 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
ASabD	-	18 (100%)	10 (100%)	8 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
TE	-	15 (83,3%)	7 (70%)	8 (100%)	0,216
	+	3 (16,7%)	3 (30%)	0 (0%)	
ASE	-	15 (83,3%)	7 (70%)	8 (100%)	0,216
	+	3 (16,7%)	3 (30%)	0 (0%)	
AMcE	-	18 (100%)	10 (100%)	8 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

## 2.2. Resultados histológicos

### 2.2.1. Resultados histológicos del tejido felino corneal criocongelado

En las dos córneas del **GC** se detectaron burbujas de crioconservación 1+. Mientras que las córneas **G≤1a** solo mostraron artefactos en un 60% de las muestras (6/10) -siendo en todos los casos de grado 1+-, las córneas **G≥6a** mostraron grados 2+ a 4+ en un 85,8% de los casos (7/8). Los artefactos secundarios a la crioconservación fueron significativamente más evidentes en **G≥6a** que en **G≤1a** ( $p < 0,001$ ) (Tabla 15).

La profundidad de los artefactos (Fig.18) queda resumida en la Tabla 15. Tal y como muestra la tabla, en las muestras **G<sub>≤1a</sub>** los artefactos se localizaron en una parte del espesor del estroma [estromal anterior y medio (4/6; 66,6%)], mientras que en el 85,7% de las muestras **G<sub>≥6a</sub>** con burbujas (6/7), éstas ocuparon todo el espesor del estroma.

**Tabla 15:** Resultados estadísticos histológicos de córnea en la especie felina. 0 = ausencia de artefactos. 4+ = cantidad máxima de artefactos.

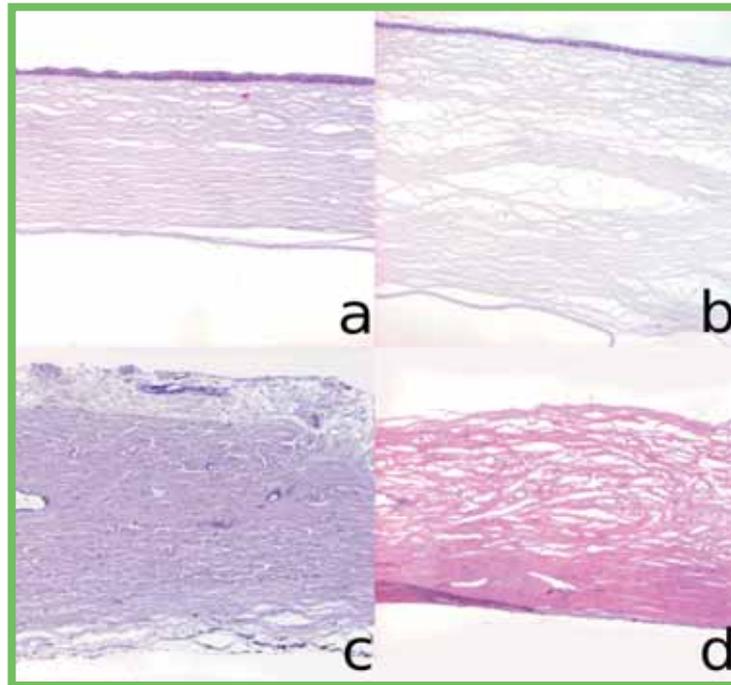
<b>Artefactos</b>	<b>Total (n=18)</b>	<b>≤ 1 año (n=10)</b>	<b>≥ 6 años (n=8)</b>	<b>p-valor</b>
0	4 (23,5%)	4 (40%)	0 (0%)	< 0,001
1+	8 (41,2%)	6 (60%)	1 (14,3%)	
2+	3 (17,6%)	0 (0%)	4 (42,9%)	
3+	1 (5,9%)	0 (0%)	1 (14,3%)	
4+	2 (11,8%)	0 (0%)	2 (28,6%)	
<b>Localización de los artefactos</b>				
Espesor completo	7 (46,2%)	1 (16,7%)	6 (71,4%)	0,759
Estroma profundo	1 (7,7%)	1 (16,7%)	0 (0%)	
Estroma medio	2 (15,4%)	2 (33,3%)	0 (0%)	
Estroma anterior	4 (30,8%)	2 (33,3%)	2 (28,6%)	

### 2.2.2. Resultados histológicos del tejido felino escleral criocongelado

En las muestras del **GC** no se detectaron burbujas de crioconservación. De forma similar a las muestra corneales, el 87,5% de las muestras esclerales **G<sub>≥6a</sub>** mostraron artefactos de grados 2+ a 4+, mientras que en muestras **G<sub>≤1a</sub>** únicamente se observaron grados de artefactos comprendidos entre 0 y 2+ (Fig.18; Tabla 16). Los artefactos secundarios a la crioconservación fueron significativamente más evidentes en **G<sub>≥6a</sub>** que en **G<sub>≤1a</sub>** (p<0,001).

**Tabla 16:** Resultados estadísticos histológicos de esclera en la especie felina. 0 = ausencia de artefactos. 4+ = cantidad máxima de artefactos.

Artefactos	Total (n=18)	≤ 1 año (n=10)	≥ 6 años (8)	p-valor
0	7 (38,9%)	7 (70%)	0 (0%)	< 0,001
1+	4 (22,2%)	3 (30%)	1 (12,5%)	
2+	3 (16,7%)	0 (0%)	3 (37,5%)	
3+	3 (16,7%)	0 (0%)	3 (37,5%)	
4+	1 (5,6%)	0 (0%)	1 (12,5%)	



**Figura 18:** Imagen histológica 4x de los artefactos (burbujas) corneales y esclerales en el gato. **a:** Córnea normal. **b:** Córnea con artefactos 4+. **c:** Esclera normal. **d:** Esclera con artefactos 4+.

### 2.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

#### 2.3.1. MET en tejido felino corneal criocongelado

El **GC** mostró colágeno organizado en todos los casos. El colágeno se clasificó como organizado en todos los casos **G<sub>≤1a</sub>** (100%;10/10) y en el 75% de los **G<sub>≥6a</sub>** (6/8) (Tabla 17; Fig.19), siendo la diferencia entre ambos grupos no estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Los queratocitos fueron clasificados como normales en el 100% del **GC** (2/2), el 50% del **G<sub>≤1a</sub>** (5/10) y el 12,5% del **G<sub>≥6a</sub>** (1/8) ( $p>0,05$ ). Los queratocitos restantes en el **G<sub>≤1a</sub>** fueron clasificados como apoptóticos (5/10), así como la mayoría de los queratocitos del **G<sub>≥6a</sub>** (75%;6/8) (Tabla 17; Fig.20).

**Tabla 17:** Resultados estadísticos de microscopía electrónica de transmisión de córnea en la especie felina.

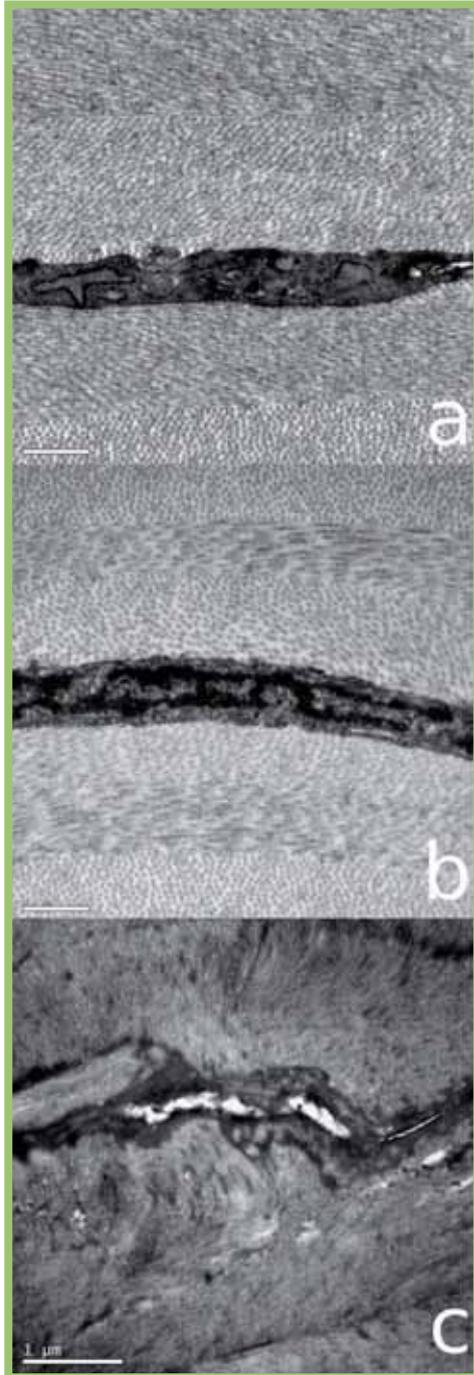
<b>Estructura del colágeno</b>	<b>Total (n=36)</b>	<b>≤ 1 año (n=20)</b>	<b>≥ 6 años (n=16)</b>	<b>p-valor</b>
Organizado	16 (88,9%)	10 (100%)	6 (75%)	0,159
Semiorganizado	2 (11,1%)	0 (0%)	2 (25%)	
<b>Queratocitos</b>				
Normales	6 (33,3%)	5 (50,0%)	1 (12,5%)	0,099
Apoptóticos	11 (61,1%)	5 (50,0%)	6 (75,0%)	
Necróticos	1 (5,6%)	0 (0,0%)	1 (12,5%)	

### 2.3.2. MET en tejido felino escleral criocongelado

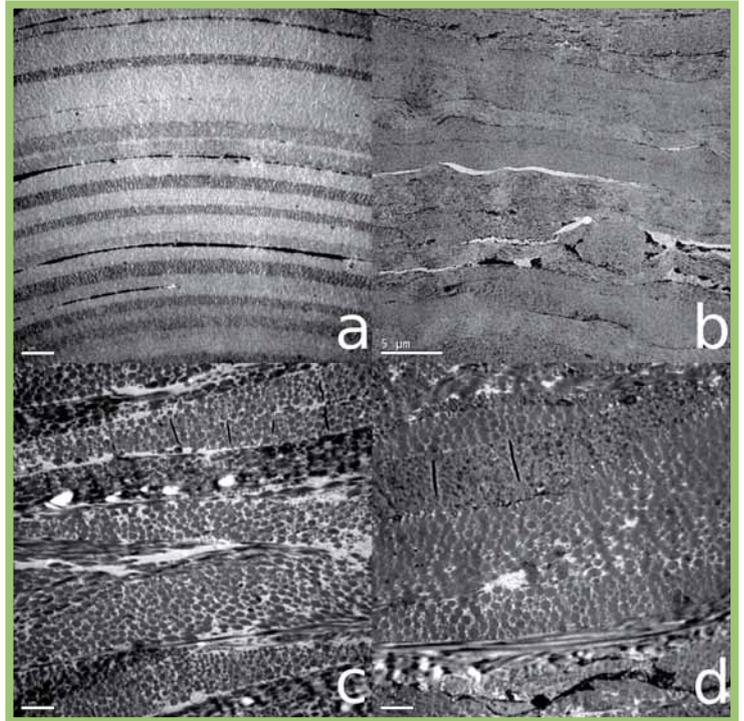
El **GC** evidenció colágeno organizado en todos los casos. Las escleras del grupo **G<sub>≤1a</sub>** se clasificaron mayoritariamente como organizadas (60%;6/10) y las del **G<sub>≥6a</sub>** como semiorganizadas (62,5%;5/8) ( $p>0,05$ ) (Tabla 18; Fig. 19).

**Tabla 18:** Resultados estadísticos de microscopía electrónica de transmisión de esclera en la especie felina.

<b>Estructura del colágeno</b>	<b>Total (n=36)</b>	<b>≤ 1 año (n=20)</b>	<b>≥ 6 años (n=16)</b>	<b>p-valor</b>
Organizado	9 (50%)	6 (60%)	3 (37,5%)	0,637
Semiorganizado	9 (50%)	4 (40%)	5 (62,5%)	



**Figura 20:** Imagen de los queratocitos del gato obtenida a 30.000x mediante microscopía electrónica de transmisión **a:** Queratocito normal. **b:** Queratocito apoptótico. **c:** Queratocito necrótico.



**Figura 19:** Imagen de la organización del colágeno del gato a 5.000x obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión **a:** Córnea normal. **b:** Córnea semiorganizada. **c:** Esclera normal. **d:** Esclera semiorganizada.

### 3. Especie equina

Durante el periodo de tiempo que duró el estudio, se obtuvieron **34 globos oculares de 17 caballos**, de diferente raza y sexo, y de edades comprendidas entre los 9 meses y los 9 años. Estos ojos se clasificaron en **GC** (n=2), **G<sub>≤1a</sub>** [n=20] y **G<sub>≥6a</sub>** [n=12]. En el **G<sub>≤1a</sub>**, los ojos se procesaron en grupos de 4 unidades, tras 1, 3, 6, 9 y 12 meses de crioconservación (T<sub>1m</sub>, T<sub>3m</sub>, T<sub>6m</sub>, T<sub>9m</sub>, T<sub>1a</sub>, respectivamente). De forma similar, en el **G<sub>≥6a</sub>** se procesaron los ojos también en grupos de 4, pero a los 7, 8 y 9 años de crioconservación (T<sub>7a</sub>, T<sub>8a</sub>, T<sub>9a</sub>, respectivamente).

#### 3.3. Resultados microbiológicos

##### 3.3.1. Resultado microbiológico del tejido equino corneal criocongelado

El estudio microbiológico del **GC** no mostró crecimiento alguno, ni en siembra directa ni en enriquecimiento. De forma similar, tampoco hubo crecimiento directo en las muestras **G<sub>≤1a</sub>** y **G<sub>≥6a</sub>**, pero sí leve positividad en los cultivos enriquecidos [(**G<sub>≤1a</sub>** (5%;1/20), **G<sub>≥6a</sub>** (25%;3/12)] (Tabla 19). Los microorganismos aislados fueron *Staphylococcus epidermidis* (n=2), *Staphylococcus aureus* (n=1) y *Streptococcus spp.* (*Strep. α*-hemolítico (n=1) y *Strep. β*-hemolítico (n=1)) (Tabla 20).

**Tabla 19:** Resultados estadísticos de la microbiología de la córnea en la especie equina. ASD: Agar Sangre cultivo directo. AMcD: Agar McConkey cultivo directo. ASabD: Agar Sabouraud cultivo directo. TE: Turbidez enriquecimiento. ASE: Agar Sangre enriquecimiento. AMcE: Agar McConkey enriquecimiento. El p-valor indica la comparación estadística entre ambos grupos cuando se puede aplicar.

Cultivo	Resultado	Total (n=32)	≤ 1 año (n=20)	≥ 6 años (n=12)	p-valor
ASD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
AMcD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
ASabD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
TE	-	29 (90,6%)	19 (95%)	10 (83,3%)	0,540
	+	3 (9,4%)	1 (5%)	2 (16,7%)	
ASE	-	28 (87,5%)	19 (95%)	9 (75%)	0,136
	+	4 (12,5%)	1 (5%)	3 (25%)	
AMcE	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

**Tabla 20:** Microorganismos identificados y número de aislamientos en córnea de la especie equina por grupo.

Grupo	Microorganismo	Número de aislamientos
≤1 año (n=2)	<i>Staph. aureus</i>	1
	<i>Strep. α-hemolítico</i>	1
≥6 años (n=3)	<i>Staph. epidermidis</i>	2
	<i>Strep. β-hemolítico</i>	1

### 3.3.2. Resultado microbiológico del tejido equino escleral criocongelado

El **GC** no mostró crecimiento en las siembras directas, pero sí en los cultivos enriquecidos (100%;2/2), siendo el agente aislado *Strep. α-hemolítico* (Tabla 21). De forma similar, tampoco hubo crecimiento directo en las muestras **G<sub>≤1a</sub>** y **G<sub>≥6a</sub>**, pero sí leve positividad en los cultivos enriquecidos [(**G<sub>≤1a</sub>** (5%;n=1), **G<sub>≥6a</sub>** (25%;n=3)] (Tabla 22).

Los microorganismos más aislados en escleras equinas fueron *Streptococcus spp.* (*S. α-hemolítico* (n=16), *S. β-hemolítico* (n=3), *S. equinus* (n=1), *S. caprae* (n=1) y *Streptococcus spp.* (n=1)) y *Staphylococcus spp.* (*S. pseudointermedius* (n=1) y *S. epidermidis* (n=1)) (Tabla 21).

**Tabla 21:** Microorganismos identificados y número de aislamientos en esclera de la especie equina por grupo.

Grupo	Microorganismo	Número de aislamientos
≤1 año (n=14)	<i>Strep. α-hemolítico</i>	11
	<i>Strep. equinus</i>	1
	<i>Strep. caprae</i>	1
	<i>Staph. pseudintermedius</i>	1
≥6 años (n=8)	<i>Strep. α-hemolítico</i>	3
	<i>Strep. β-hemolítico</i>	3
	<i>Staph. epidermidis</i>	1
	<i>Streptococcus spp.</i>	1
Control (n=2)	<i>Strep. α-hemolítico</i>	2

**Tabla 22:** Resultados estadísticos de la microbiología de la esclera en la especie equina. ASD: Agar Sangre cultivo directo. AMcD: Agar McConkey cultivo directo. ASabD: Agar Sabouraud cultivo directo. TE: Turbidez enriquecimiento. ASE: Agar Sangre enriquecimiento. AMcE: Agar McConkey enriquecimiento. El p-valor indica la comparación estadística entre ambos grupos cuando se puede aplicar.

Cultivo	Resultado	Total (n=32)	≤ 1 año (n=20)	≥ 6 años (n=12)	p-valor
ASD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
AMcD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
ASabD	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
TE	-	18 (56,2%)	10 (50%)	8 (66,7%)	0,471
	+	14 (43,8%)	10 (50%)	4 (33,3%)	
ASE	-	13 (40,6%)	8 (40%)	5 (41,7%)	1,000
	+	19 (59,4%)	12 (60%)	7 (58,3%)	
AMcE	-	32 (100%)	20 (100%)	12 (100%)	
	+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

### 3.4. Resultado histológicos

#### 3.4.1. Resultado histológico en cornea criocongelada equina

No se observaron artefactos en el **GC**. Los artefactos secundarios a la crioconservación fueron significativamente más evidentes en tejidos del **G≥6a** que en los del **G≤1a** (p=0,002).

En el **G<sub>≤1a</sub>** los artefactos se clasificaron como leves en el 90% de los casos, mientras que en el **G<sub>≥6a</sub>** se clasificaron en su mayoría (60%) como moderados/marcados ( $p=0,02$ ) (Fig. 21; Tabla 23).

La profundidad de los artefactos queda resumida en la tabla 23. Tal y como muestra la tabla, los artefactos se localizaron principalmente una porción del espesor del estroma en el **G<sub>≤1a</sub>** [estromal profundo (12/18; 66,7%)], mientras que en el **G<sub>≥6a</sub>** la mayoría se distribuyó a lo largo de todo el espesor estromal (44,4%;4/9) ( $p=0,078$ ) (Tabla 23).

**Tabla 23:** Resultados estadísticos histológicos de córnea en la especie equina. 0 = ausencia de artefactos. 4+ = cantidad máxima de artefactos. (Nota: 2 muestras de ≥6 años no fueron valorables)

<b>Artefactos</b>	<b>Total (n=30)</b>	<b>≤ 1 año (n=20)</b>	<b>≥ 6 años (n=10)</b>	<b>p-valor</b>
0	2 (6,7%)	1 (5%)	1 (10%)	0,002
1+	21 (70%)	18 (90%)	3 (30%)	
2+	3 (10%)	1 (5%)	2 (20%)	
3+	4 (13,3%)	0 (0%)	4 (40%)	
4+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Localización de los artefactos</b>				
Espesor completo	4 (14,8%)	0 (0%)	4 (44,4%)	0,078
Estroma profundo	15 (55,6%)	12 (66,7%)	3 (33,3%)	
Estroma medio	6 (22,2%)	5 (27,8%)	1 (11,1%)	
Estroma anterior	2 (7,4%)	1 (5,6%)	1 (11,1%)	

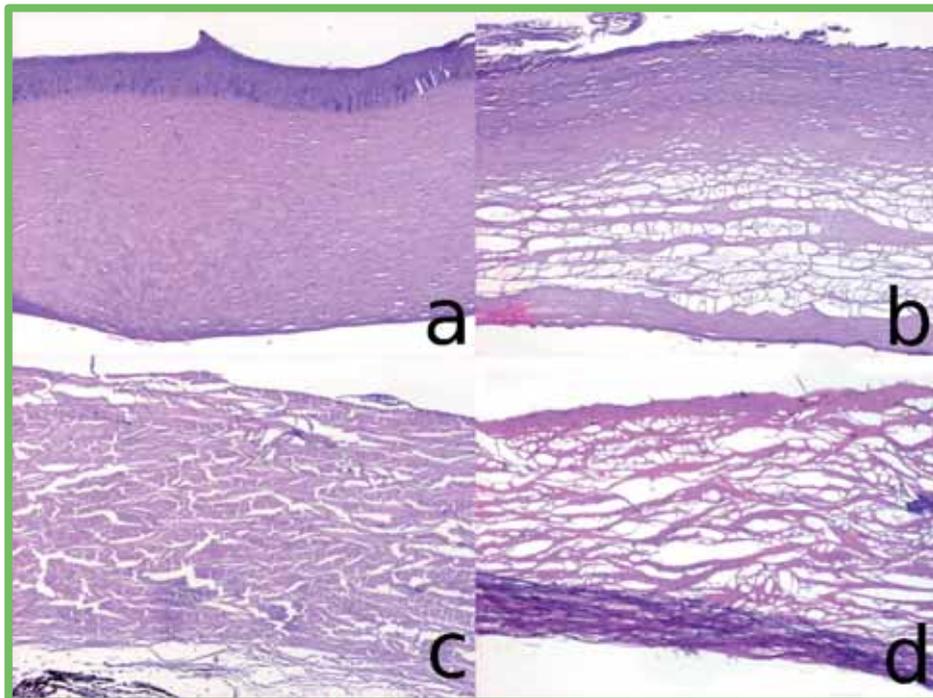
### 3.4.2. Resultado histológico en esclera criocongelada equina

El **GC** no mostró artefactos de criocongelación, a diferencia de las muestras de los grupos del estudio, en las que se sí se observaron, siendo éstas más evidentes en tejidos crioconservados del **G<sub>≥6a</sub>** que en las del **G<sub>≤1a</sub>** ( $p<0,001$ ) (Tabla 24).

Así mismo, el 70% de las muestras **G $\geq$ 6a** mostraron artefactos de grados 3+ - 4+, mientras que en muestras del **G $\leq$ 1a** únicamente se observaron grados de artefactos comprendidos entre 0 y 2+ ( $p < 0,001$ ) (Tabla 24; Fig. 21).

**Tabla 24:** Resultados estadísticos histológicos de esclera en la especie equina. 0 = ausencia de artefactos. 4+ = cantidad máxima de artefactos. (Nota: 2 muestras de  $\geq 6$  años no fueron valorables)

Artefactos	Total (n=30)	$\leq 1$ año (n=20)	$\geq 6$ años (n=10)	p-valor
0	5 (16,7%)	5 (25%)	0 (0%)	< 0,001
1+	12 (40%)	12 (60%)	0 (0%)	
2+	6 (20%)	3 (15%)	3 (30%)	
3+	4 (13,3%)	0 (0%)	4 (40%)	
4+	3 (10%)	0 (0%)	3 (30%)	



**Figura 21:** Imagen histológica 4x de los artefactos corneales y esclerales en el caballo. **a:** Córnea normal. **b:** Córnea con artefactos 4+. **c:** Esclera normal. **d:** Esclera con artefactos 4+.

### 3.5. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

#### 3.5.1. MET en tejido equino corneal criocongelado

Las muestras control evidenciaron colágeno semiorganizado en una muestra (50%;1/2). El colágeno se clasificó mayoritariamente como organizado en ambos grupos de conservación corneal [**G<sub>≤1a</sub>** (80%;16/20) y **G<sub>≥6a</sub>** (83,3%;10/12)] (Tabla 25; Fig. 22). Ninguna de las muestras estudiadas fue clasificada como desorganizada.

Los queratocitos del **GC** fueron clasificados como normales; los de las muestras del **G<sub>≤1a</sub>** como normales (60%;12/20) y apoptóticos (40%;8/20) y los del **G<sub>≥6a</sub>** como apoptóticos (90%;9/10) y necróticos (10%;1/10). Las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas ( $p=0,001$ ). En dos muestras **G<sub>≥6a</sub>** no se encontraron queratocitos (Tabla 25; Fig.23).

**Tabla 25:** Resultados de microscopía electrónica de transmisión de córnea en tejido corneoescleral crioconservado equino.

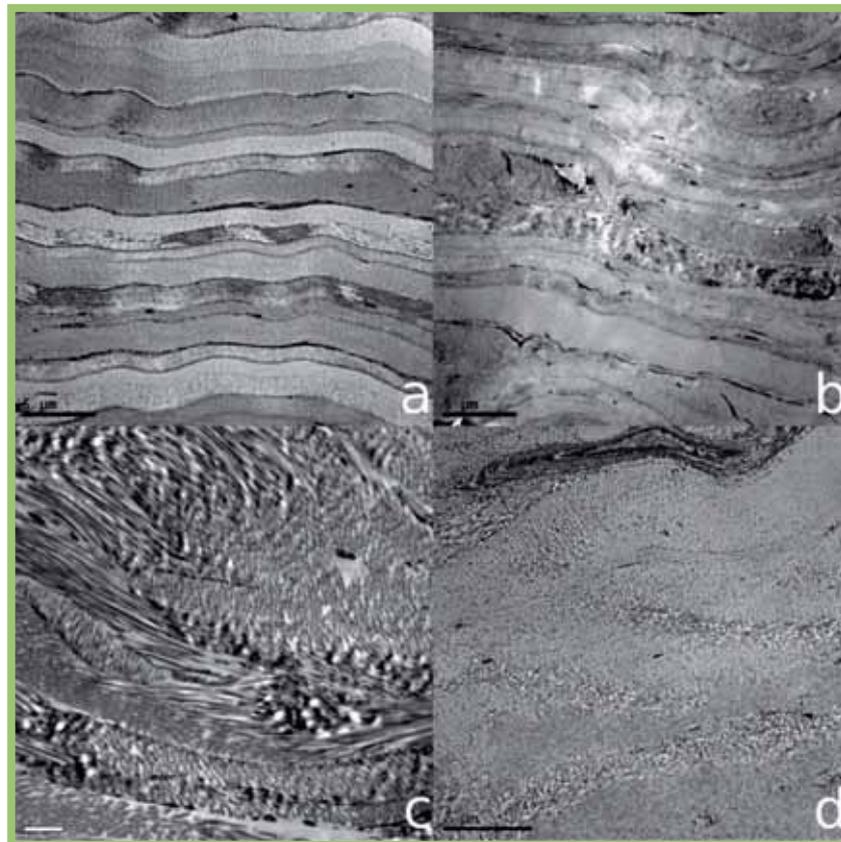
<b>Estructura del colágeno</b>	<b>Total (n=32)</b>	<b>≤ 1 año (n=20)</b>	<b>≥ 6 años (n=12)</b>	<b>p-valor</b>
Organizado	26 (81,2%)	16 (80%)	10 (83,3%)	1,000
Semiorganizado	6 (18,8%)	4 (20%)	2 (16,7%)	
<b>Queratocitos</b>				
Normales	12 (40%)	12 (60%)	0 (0%)	0,001
Apoptóticos	17 (56,7%)	8 (40%)	9 (90%)	
Necróticos	1 (3,3%)	0 (0%)	1 (10%)	

### 3.5.2. MET en tejido equino escleral criocongelado

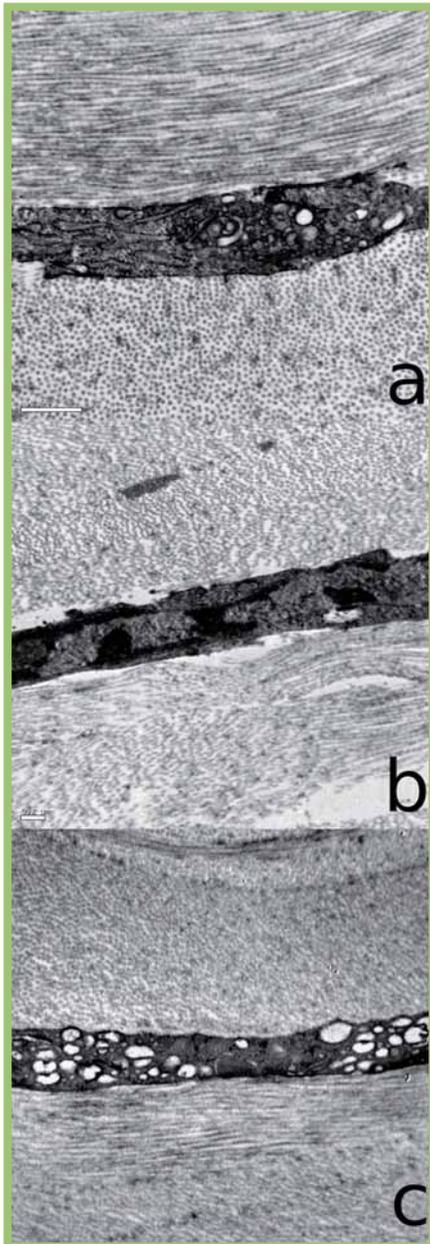
Las muestras control evidenciaron colágeno organizado. Al igual que en el tejido corneal, el colágeno se clasificó mayoritariamente como organizado en ambos grupos de conservación escleral [**G<sub>≤1a</sub>** (65%;13/20) y **G<sub>≥6a</sub>** (75%;9/12)] (Tabla 26; Fig.22). Ninguna de las muestras estudiadas fue clasificada como desorganizada.

**Tabla 26:** Resultados de microscopía electrónica de transmisión de esclera en tejido corneoescleral crioconservado equino.

<b>Estructura del colágeno</b>	<b>Total (n=32)</b>	<b>≤ 1 año (n=20)</b>	<b>≥ 6 años (n=12)</b>	<b>p-valor</b>
Organizado	22 (68,8%)	13 (65%)	9 (75%)	0,703
Semiorganizado	10 (31,2%)	7 (35%)	3 (25%)	



**Figura 22:** Microscopía electrónica a 5.000x de la organización del colágeno esclerocorneal del caballo. **a:** Córnea normal. **b:** Córnea semiorganizada. **c:** Esclera normal. **d:** Esclera semiorganizada.



**Figura 23:** Imagen de los queratocitos del caballo obtenida a 30.000x mediante microscopía electrónica de transmisión **a:** Queratocito normal. **b:** Queratocito apoptótico 4+. **c:** Queratocito necrótico, nótese la marcada vacuolización intracitoplasmática.

---

## *Discusión*

---

La presente tesis doctoral demuestra que la crioconservación corneal y escleral a -20°C en las especies canina, felina y equina, reduce la flora microbiológica e induce apoptosis de los queratocitos con el paso del tiempo, preservando la ultraestructura del colágeno durante un período de, al menos, 8 años en el perro, 10 años en el gato y 9 años en el caballo.

### ***Estudio microbiológico***

**Los microorganismos aislados** en los tejidos corneoesclerales de la presente tesis doctoral son **bacterias**, mayoritariamente de la flora normal de piel y conjuntiva,<sup>76,77,79</sup> siendo los géneros más aislados ***Staphylococcus*** y ***Streptococcus spp.*** En el perro, la especie más aislada fue ***S. pseudintermedius***, uno de los agentes causales de la pioderma canina que se encuentra principalmente en perros inmunodeprimidos.<sup>81</sup> En el gato, la bacteria más aislada fue ***Staphylococcus simulans***, que se ha descrito como un microorganismo poco frecuente en gatos y en ningún caso como patógeno ocular.<sup>82,83</sup> En el caballo, la especie más frecuentemente aislada fue ***Streptococcus α-hemolítico***, habiéndose descrito ocasionalmente en la flora normal del ojo equino. A pesar de que éste último organismo se ha asociado a infecciones respiratorias, septicemias neonatales y mastitis en el caballo, no hay estudios que lo asocien a problemas oculares.<sup>84-89</sup>

Aunque **la mayoría de las especies bacterianas aisladas en el presente estudio no son potencialmente patógenas**, otras especies de *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Clostridium* aislados sí que pueden serlo,

especialmente en animales inmunodeprimidos.<sup>81,90-93</sup> La inmunosupresión local es una de las herramientas farmacológicas más importantes utilizadas para el control del rechazo tras la realización de queratoplastias o escleroplastias.<sup>94</sup> El estado microbiológico del tejido donante puede influenciar directamente el postoperatorio inmediato, sobretodo tras inducir inmunosupresión local.

Los hallazgos microbiológicos del presente estudio hacen patente, en la mayoría de casos, la necesidad de medios de enriquecimiento y de condiciones muy específicas para obtener crecimiento bacteriano; condiciones que, por definición, están ausentes en la superficie ocular. A pesar de que **el crecimiento bacteriano observado en el presente estudio no supondría un riesgo para el receptor**, los resultados microbiológicos podrían mejorarse mediante varias estrategias, tales como: implementación del proceso de descontaminación (aumentando el número de ciclos de limpieza o modificando el producto utilizado) o variando el antibiótico tópico utilizado tras la enucleación. El trimetoprim-polimixina B instilado en las muestras de la presente tesis, es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro y, aunque en su espectro de actuación se encuentran la mayoría de bacterias aisladas, el hecho de ser bacteriostático y mostrar resistencias a algunas colonias de *S. pseudintermedius*,<sup>95</sup> podría replantear su uso.

Otras opciones antibióticas posibles que han demostrado más efectividad sobre algunos de los microorganismos aislados en este estudio son la amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefalotina, amikacina,

gentamicina, enrofloxacin, cloranfenicol, rifampicina o ciprofloxacino.<sup>95,96</sup>

Por lo tanto, teniendo en cuenta la disponibilidad del producto tópico y la actividad bactericida de los antibióticos anteriormente citados, el ciprofloxacino podría ser una opción adecuada para mejorar la cobertura antibiótica del tejido corneoescleral crioconservado a -20°C en el perro, el gato y el caballo.

A pesar de utilizar el mismo antibiótico tópico y protocolo de descontaminación en las tres especies estudiadas, **la esclera equina mostró mayor crecimiento bacteriano que el resto de tejidos**. Dado que el protocolo fue idéntico en las tres especies, la diferencia obtenida podría estar asociada a la inadecuada distribución del antibiótico en el tejido escleral, probablemente asociada al mayor tamaño del globo. Es por ello recomendable que, con el fin de asegurar la distribución adecuada del antibiótico, el protocolo de preparación en ojos donantes de mayor tamaño incluya mayor cantidad de antibiótico.

La conservación a bajas temperaturas ha demostrado reducir la carga bacteriana pero, hasta la fecha, no se había valorado en tejido corneoescleral.<sup>97</sup> Por definición, la reducción de la temperatura baja el metabolismo, la multiplicación celular y favorece la creación de cristales intracelulares que rompen las membranas y producen la muerte celular del posible agente infeccioso.<sup>98,99</sup>

El presente estudio pone de manifiesto una **tendencia a la disminución de la carga bacteriana del tejido corneoescleral conservado a -20°C con el tiempo**, siendo más marcada en el perro y el gato.

De este hallazgo se deduce que, desde un punto de vista meramente microbiológico, sería más seguro utilizar tejido criocongelado que fresco para la realización de queratoplastias o escleroplastias, sobretodo en el perro y el gato.

A pesar de que algunos agentes fúngicos, tales como *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Eurotium spp.* y *Alternaria spp.* se han detectado en la flora normal de la superficie ocular de los animales domésticos, los cultivos fúngicos realizados en este estudio fueron negativos.<sup>100-102</sup> Este hecho podría estar asociado a la eficacia del protocolo de descontaminación utilizado, o a las condiciones medioambientales de la zona geográfica, siendo las queratomicosis poco frecuentes en Europa sobretodo en humanos, perros y gatos.<sup>101-105</sup>

### ***Estudio ultraestructural y TUNEL***

El presente trabajo estudia, por primera vez, la organización del colágeno corneoescleral a lo largo de largos periodos de criocongelación a -20°C, en diferentes especies animales. Las fibras de colágeno del tejido corneal y del escleral, **mantienen su organización a lo largo del tiempo de conservación, por lo que ambos tejidos criocongelados podrían utilizarse potencialmente para la reconstrucción del globo ocular (trasplante tectónico).**

En el caso concreto de las queratoplastias, la transparencia corneal resultante dependerá, en gran medida, de la viabilidad del endotelio corneal.<sup>106</sup>

Así pues, en **lesiones corneales perforantes**, con pérdida de endotelio, el tejido donante congelado no proporcionaría transparencia (por no proveer células endoteliales viables), pero sí soporte tectónico, permitiendo la reconstrucción del globo ocular.<sup>21,24,30-32,107</sup> Por el contrario, en **lesiones corneales de espesor parcial**, en las que el receptor mantiene el endotelio, las queratoplastias laminares con tejido congelado tendrían un objetivo doble; tectónico y, a la vez, visual. La transparencia final de la queratoplastia laminar dependerá en gran medida de la técnica y experiencia del cirujano, pero también de la organización del colágeno del tejido donante -a mejor técnica quirúrgica y mayor organización de las fibras de colágeno, menor fibrosis corneal.<sup>30,31,107</sup>

La **clasificación de los queratocitos** se realizó mediante el microscopio electrónico de transmisión, que aunque se considera una clasificación válida,<sup>54,62</sup> tiene cierto componente subjetivo. Por ello se realizó una prueba colorimétrica de detección de apoptosis, mediante TUNEL, en un porcentaje de muestras corneales caninas seleccionadas aleatoriamente. A pesar de que esta técnica puede dar falsos positivos, clasificando células necróticas como apoptóticas,<sup>108-111</sup> el resultado numérico no mostró diferencias estadísticamente significativas con la MET ( $p>0,05$ ), confirmando su especificidad y sensibilidad para la clasificación de los queratocitos.<sup>54,62</sup>

La presente tesis doctoral demuestra que **el tiempo de criocongelación del tejido corneal presenta relación inversa con el número total de queratocitos** (en la especie canina y felina), y relación directa con la **mortalidad de los queratocitos (apoptosis)** (en las 3 especies).

Ésta última relación se ha descrito previamente en el hombre y en especies animales tales como el cerdo y el conejo, en los que la apoptosis es, con diferencia, el mecanismo de mortalidad más importante en el tejido corneal congelado.<sup>60,62,82</sup> La apoptosis ha demostrado ser el tipo de mortalidad celular más frecuente en tejido esclerocorneal criocongelado en rangos de temperatura comprendidos entre los -80°C y los -196 °C.<sup>60,62,82</sup>

El aumento de la apoptosis y la reducción del número de queratocitos **podría asociarse a la disminución del rechazo del tejido corneal congelado, en comparación con el tejido corneal fresco**. Esta afirmación se basa en la capacidad antigénica elevada de las células vivas trasplantadas (queratocitos, células epiteliales y células endoteliales), pero reducida del colágeno.<sup>112</sup> Esta teoría defiende la posibilidad de utilizar tejido esclerocorneal heterólogo congelado en base a su baja antigenicidad. Esta hipótesis requiere, para ser confirmada, la realización de un estudio clínico que valore la incidencia de rechazo corneal según el tipo de conservación del tejido donante.

### ***Estudio histológico***

Los **artefactos de congelación** detectados en el estudio histológico **aumentan con el paso del tiempo**, pero no interfieren con la distribución normal del colágeno valorada mediante microscopio óptico y MET.

Estos artefactos, descritos previamente en otros tejidos congelados, tienen forma de burbujas de gas, se producen durante la congelación y descongelación, y son debidos a la formación de hielo que produce cambios

fisicoquímicos y biofísicos durante el proceso.<sup>113-115</sup> Aparecen tanto en tejido corneal como escleral y no hay grandes diferencias en el grado de artefactos entre tejidos. En el tejido corneal, las burbujas tienden a localizarse en diferentes profundidades estromales según el tiempo de criocongelación del tejido, adoptando una distribución superficial en muestras jóvenes, pero extendiéndose a todo el espesor estromal con el tiempo. Este patrón de distribución de los artefactos, podría estar asociado al patrón de exposición del tejido a bajas temperaturas, ya que la zona más externa, y por lo tanto más expuesta al frío, parece ser la primera afectada.

**En base a las características microbiológicas, microscópicas y ultraestructurales observadas en el tejido corneoescleral crioconservado a -20°C, los tejidos son aptos para realizar trasplantes tectónicos tanto corneales como esclerales, durante periodos de, al menos 8 años en el perro, 10 años en el gato y 9 años en el caballo.** Esta información, de gran importancia en el campo de la oftalmología veterinaria, tiene aplicación directa en los bancos de ojos crioconservados, estableciendo el periodo de tiempo máximo de conservación de los tejidos donantes.

---

## *Conclusiones*

---

1.- La crioconservación de córnea y esclera en la especie canina, felina y equina a -20°C es segura, tanto desde el punto de vista estructural como microbiológico, pudiendo utilizarse los tejidos al menos durante 8 años en la especie canina, 10 años en la especie felina y 9 años en la especie equina.

2.- La carga microbiológica de las muestras caninas, felinas y equinas crioconservadas a -20°C, disminuye al aumentar el tiempo de crioconservación.

3.- La combinación de antibióticos trimetoprim-polimixina B disminuye la carga bacteriana del tejido corneoescleral canino, felino y equino crioconservado a -20°C, pero no la elimina completamente.

4.- La muerte celular de las muestras crioconservadas a -20°C, en la especie canina, felina y equina, se produce casi en su totalidad mediante apoptosis.

5.- El proceso de muerte celular o apoptosis del tejido corneal crioconservado a -20°C, se acentúa con el tiempo en las especies canina, felina y equina.

6.- La microestructura del colágeno corneoescleral crioconservado a -20°C se preserva durante al menos 8 años en el perro, 10 años en el gato y 9 años en el caballo.

---

## *Futuros estudios*

---

A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, se abre la puerta a diferentes líneas de investigación, tales como:

1. **Estudios microbiológicos** para determinar el antibiótico o los desinfectantes más indicados para reducir la flora bacteriana del tejido donante criopreservado a -20°C.
2. **Estudio clínico** realizando queratoplastias o escleroplastias en pacientes que así lo requieran, utilizando tejidos criopreservados a -20°C durante diferentes periodos de tiempo. Valorar los resultados, porcentaje de éxitos y posibles complicaciones.
3. **Estudio clínico** realizando queratoplastias o escleroplastias en pacientes que así lo requieran, utilizando tejidos criopreservados a -20°C de diferentes especies animales. Valorar los resultados, porcentaje de éxitos y posibles complicaciones.
4. Estudiar el comportamiento del tejido esclerocorneal a **temperaturas más bajas** (-80°C o nitrógeno líquido), valorando la viabilidad de las células corneales (queratocitos, células epiteliales y células endoteliales).
5. Valorar el efecto de **criopreservantes o inhibidores de la apoptosis** sobre el tejido corneal, pudiendo mantener el endotelio corneal viable a pesar de estar congelado.
6. Valorar el efecto del cross-linking sobre la estructura corneal del tejido donante.

---

# *Resumen*

---

**Objetivo:** Determinar la viabilidad y la seguridad microbiológica del tejido corneal y escleral canino [c], felino [f] y equino [e] crioconservado a -20°C, comparando tejidos crioconservados durante menos de 1 año (**G≤1a**) con aquellos crioconservados durante largos periodos de tiempo (**G≥6a**).

**Materiales y métodos:** Treinta y seis globos oculares de perro, 20 de gato, y 34 de caballo se obtuvieron de la Fundació Hospital Clínic Veterinari entre 2003 y 2013. Todos los animales estaban libres de neoplasias o enfermedades infecciosas y no presentaban alteraciones oculares. Tras un protocolo de descontaminación, los ojos se enuclearon en condiciones estériles antes de las 10 horas post-mortem. Los globos se almacenaron a -20°C en condiciones atmosféricas con un antibiótico de amplio espectro y se mantuvieron a esa temperatura durante diferentes periodos de tiempo hasta su análisis. Se realizaron estudios microbiológicos, histológicos y ultraestructurales, tanto del tejido corneal como del escleral. La microbiología consistió en sembrar las muestras de córnea y esclera en agar sangre, McConkey y Sabouraud, y en caldo de cultivo cerebro-corazón. Histológicamente se evaluaron los artefactos de crioconservación y mediante microscopia electrónica de transmisión se analizó la integridad del colágeno, y se establecieron el número y las características de los queratocitos, clasificándolos en normales, apoptóticos y necróticos. En una selección de muestras caninas se comprobó la muerte celular por apoptosis mediante TUNEL.

**Resultados. Microbiología:** Los cultivos directos de los **G≤1a** fueron positivos en un 27,5% [c], 15,0% [f] y 0% [e] y los de los **G≥6a** en un 0% [c], 0% [f] y 0% [e]. Los cultivos enriquecidos de los **G≤1a** fueron positivos en un 47,5% [c], 30,0% [f] y 27,5% [e] y los de los **G≥6a** en un 16,7% [c], 0% [f] y 25,0% [e]. **Histopatología:** En las tres especies, los artefactos de crioconservación fueron más frecuentes en muestras **G≥6a** que en **G≤1a**. **MET:** El tipo de queratocito predominante fue el apoptótico en todas las muestras de las 3 especies. La estructura del colágeno se conservó a lo largo del tiempo, clasificándose como organizada o semiorganizada en todos los casos, excepto en una muestra de córnea canina.

**Conclusión.** El tejido corneal y escleral canino, felino y equino puede crioconservarse a -20°C y utilizarse al menos durante 8, 10 y 9 años respectivamente sin impedimentos microbiológicos o estructurales. El paso del tiempo parece reducir la contaminación bacteriana en estos tejidos. La apoptosis es la vía de muerte celular más importante para los queratocitos criocongelados a -20°C.

---

# *Anexos*

---





**Anexo 3:** Tabla para los resultados del estudio ultraestructural, mediante microscopía electrónica de transmisión.

Nº Caso/ Tejido	Número Queratocitos			Fecha:
	Normales	Apoptóticos	Necróticos	Estructura colágeno
1 / Córnea				
1 / Esclera				
2 / Córnea				
2 / Esclera				
3 / Córnea				
3 / Esclera				

**Anexo 4:** Tabla para la toma de resultados TUNEL. Se tomaron 20 imágenes por muestra y se realizó una media ponderada.

<b>Toma</b>	<b>Queratocitos totales</b>	<b>Queratocitos apoptóticos</b>	<b>%</b>
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
<b>MEDIA</b>			

## Anexo 5: Tablas de resultados de la especie canina.

## - Microbiología:

Caso	Tiempo	Tejido	Cultivo directo			Cultivo enriquecido - BHB		
			AS	AMC	ASab	Turbidez	AS	AMC
1	8 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
2	8 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
3	8 años	C	0	0	0	+	<i>Bacillus spp.</i>	0
		E	0	0	0	+	<i>Bacillus spp.</i>	0
4	8 años	C	0	0	0	+	<i>Streptococcus spp.</i>	0
		E	0	0	0	0	0	0
5	7 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
6	7 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
7	7 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
8	7 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
9	6 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
10	6 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
11	6 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Bacillus circulans</i>	0
12	6 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
13	1 año	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Bacilo gram + (posible Nocardia spp.)</i>	0
14	1 año	C	+	0	0	+	<i>Staph. pseudointermedius</i>	0
		E	+	0	0	+	<i>Staph. pseudointermedius</i>	0
15	1 año	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
16	1 año	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
17	9 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
18	9 meses	C	0	0	0	0	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0
		E	0	0	0	+	<i>Streptococcus alpha</i>	0

Caso	Tiempo	Tejido	Cultivo directo			Cultivo enriquecido - BHB		
			AS	AMC	ASab	Turbidez	AS	AMC
19	9 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
20	9 meses	C	0	0	0	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0
		E	0	0	0	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0
21	6 meses	C	+	0	0	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0
		E	+	0	0	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0
22	6 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
23	6 meses	C	0	0	0	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0
		E	0	0	0	0	0	0
24	6 meses	C	+	0	0	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0
		E	+	0	0	+	<i>Staph. pseudointermedius</i>	0
25	3 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
26	3 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Clostridium perfringens</i>	0
27	3 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
28	3 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Staph. pseudointermedius</i>	0
29	1 mes	C	0	0	0	0	<i>Staph. pseudointermedius</i>	0
		E	+	0	0	+	<i>Staph. pseudointermedius</i>	0
30	1 mes	C	+	0	0	+	<i>Staph. pseudointermedius</i>	0
		E	+	0	0	+	<i>Staph. pseudointermedius</i>	0
31	1 mes	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Staph. pseudointermedius</i> + <i>Streptococcus alpha</i>	0
32	1 mes	C	+	0	0	+	<i>Bacillus cereus</i>	0
		E	+	0	0	+	<i>Bacillus cereus</i> + <i>Pseudomonas spp.</i>	0
33	Control	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Staphylococcus spp.</i>	0
34	Control	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	0
35	Control	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
36	Control	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0

- **Histología:**

<b>Caso</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Córnea</b>	<b>Localización en córnea</b>	<b>Esclera</b>
1	8 años	1+	Espesor completo	2+
2	8 años	3+	Estroma Anterior	3+
3	8 años	3+	Estroma Anterior	2+
4	8 años	2+	Estroma Anterior y Estroma Profundo	4+
5	7 años	4+	Espesor completo	4+
6	7 años	3+	Espesor completo	4+
7	7 años	4+	Espesor completo	4+
8	7 años	2+	Estroma Anterior	4+
9	6 años	4+	Espesor completo	4+
10	6 años	3+	Estroma Anterior y Estroma medio	3+
11	6 años	4+	Espesor completo	4+
12	6 años	3+	Estroma Anterior y Estroma Profundo	4+
13	1 año	0	-	1+
14	1 año	2+	Espesor completo	2+
15	1 año	0	-	1+
16	1 año	0	-	1+
17	9 meses	0	-	1+
18	9 meses	0	-	0
19	9 meses	0	-	0
20	9 meses	1+	Estroma Anterior y Estroma medio	1+
21	6 meses	1+	Estroma Anterior y Estroma medio	2+
22	6 meses	1+	Estroma Anterior	0
23	6 meses	2+	Estroma Anterior	2+
24	6 meses	0	-	1+
25	3 meses	1+	Estroma Profundo	1+
26	3 meses	2+	Estroma Anterior	2+
27	3 meses	1+	Estroma Anterior y Estroma medio	1+
28	3 meses	1+	Espesor completo	1+
29	1 mes	3+	Espesor completo	2+
30	1 mes	1+	Estroma Anterior	1+
31	1 mes	0	-	1+
32	1 mes	1+	Estroma Anterior y Estroma Profundo	1+
33	Control	2+	Estroma Anterior y Estroma medio	1+
34	Control	1+	Estroma Anterior y Estroma medio	1+
35	Control	0	-	0
36	Control	2+	Espesor completo	1+

## - Microscopía electrónica de transmisión:

Caso	Tiempo	Queratocitos							Estructura del colágeno	
		No	PNo	A	PA	Ne	PNe	Total	Córnea	Esclera
1	8 años	0	0	4	0	0	0	4	Organizado	Organizado
2	8 años	0	0	3	0	0	1	4	Semiorganizado	Semiorganizado
3	8 años	0	0	5	1	0	0	6	Organizado	Semiorganizado
4	8 años	0	0	8	0	0	1	9	Organizado	Semiorganizado
5	7 años	0	0	10	0	0	0	10	Organizado	Semiorganizado
6	7 años	0	0	1	3	2	0	6	Desorganizado	Semiorganizado
7	7 años	0	0	6	1	0	2	9	Semiorganizado	Semiorganizado
8	7 años	0	0	4	2	6	2	14	Organizado	Semiorganizado
9	6 años	0	0	4	0	0	0	4	Semiorganizado	Semiorganizado
10	6 años	0	0	10	0	0	1	11	Semiorganizado	Organizado
11	6 años	0	0	4	2	0	1	7	Semiorganizado	Organizado
12	6 años	1	0	13	0	0	0	14	Organizado	Organizado
13	1 año	1	0	5	0	0	0	6	Organizado	Organizado
14	1 año	0	0	8	0	0	0	8	Organizado	Semiorganizado
15	1 año	2	0	6	0	0	0	8	Organizado	Organizado
16	1 año	0	0	7	0	0	0	7	Organizado	Organizado
17	9 meses	0	0	10	0	0	1	11	Organizado	Semiorganizado
18	9 meses	0	0	5	0	0	0	5	Semiorganizado	Semiorganizado
19	9 meses	0	0	4	0	0	0	4	Semiorganizado	Semiorganizado
20	9 meses	0	0	4	2	0	0	6	Organizado	Organizado
21	6 meses	2	0	4	1	1	0	8	Organizado	Organizado
22	6 meses	2	0	6	0	0	0	8	Organizado	Organizado
23	6 meses	0	0	6	0	1	0	7	Organizado	Organizado
24	6 meses	0	0	0	0	6	0	6	Semiorganizado	Semiorganizado
25	3 meses	13	0	3	1	1	1	19	Organizado	Organizado
26	3 meses	17	0	4	0	0	1	22	Organizado	Organizado
27	3 meses	2	0	9	2	1	0	14	Organizado	Organizado
28	3 meses	1	0	6	0	2	0	9	Organizado	Organizado
29	1 mes	6	0	6	1	0	0	13	Organizado	Organizado
30	1 mes	7	0	4	0	1	1	13	Organizado	Organizado
31	1 mes	7	0	4	2	1	0	14	Organizado	Organizado
32	1 mes	2	0	2	0	0	1	5	Organizado	Organizado
33	Control	9	0	1	1	0	1	12	Organizado	Organizado
34	Control	10	0	0	0	0	0	10	Organizado	Organizado
35	Control	13	0	0	0	0	0	13	Organizado	Organizado
36	Control	9	0	0	0	0	0	9	Organizado	Organizado

## - TUNEL:

<b>Caso</b>	<b>Tiempo</b>	<b>% queratocitos apoptóticos</b>
1	8 años	82,5%
2	8 años	85,4%
3	8 años	88,9%
4	8 años	85,1%
5	7 años	82,1%
6	7 años	90,5%
7	7 años	87,9%
8	6 años	89,6%
9	6 años	87,5%
10	6 años	82,1%
11	6 años	79,4%
12	6 meses	86,8%
13	6 meses	89,0%
14	6 meses	80,6%
15	6 meses	84,3%
16	3 meses	83,6%
17	3 meses	89,8%
18	3 meses	79,8%
19	3 meses	90,9%
20	1 mes	85,3%
21	1 mes	88,3%
22	1 mes	87,1%

**Anexo 6:** Tablas de los resultados para la especie felina.**- Microbiología:**

Caso	Tiempo	Tejido	Cultivo directo			Cultivo enriquecido - BHB		
			AS	AMC	ASab	Turbidez	AS	AMC
1	10 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
2	10 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
3	10 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
4	10 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
5	10 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
6	10 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
7	10 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
8	7 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
9	1 año	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
10	1 año	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
11	9 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
12	9 meses	C	0	0	0	+	<i>Clostridium sp.</i>	0
		E	0	0	0	+	<i>Clostridium sp.</i>	0
13	6 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
14	6 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
15	3 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
16	3 meses	C	0	0	0	+	<i>Staphylococcus simulans</i>	0
		E	+	0	0	+	<i>Staphylococcus simulans</i>	0
17	1 mes	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
18	1 mes	C	+	0	0	+	<i>Staphylococcus sp. (coag.-)</i>	0
		E	+	0	0	+	<i>Staphylococcus sp. (coag.-)</i>	0
19	Control	C	0	0	0	0	0	0

Caso	Tiempo	Tejido	Cultivo directo			Cultivo enriquecido - BHB		
			AS	AMC	ASab	Turbidez	AS	AMC
20	Control	E	+	0	0	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0
		C	0	0	0	+	<i>Bacillus sp.</i>	0
		E	+	0	0	+	<i>Staphylococcus simulans</i>	0

- **Histología:**

Caso	Tiempo	Córnea	Localización en córnea	Esclera
1	10 años	3+	Espesor completo	3+
2	10 años	2+	Espesor completo	2+
3	10 años	4+	Espesor completo	2+
4	10 años	1+	Espesor completo	3+
5	10 años	2+	Tercio superior	4+
6	10 años	2+	Tercio superior	2+
7	10 años	-	-	1+
8	7 años	4+	Espesor completo	3+
9	1 año	1+	Tercio superior	1+
10	1 año	1+	Tercio superior	1+
11	9 meses	0	-	0
12	9 meses	1+	Tercio inferior	1+
13	6 meses	0	-	0
14	6 meses	0	-	0
15	3 meses	0	-	0
16	3 meses	1+	Estroma medio	0
17	1 mes	1+	Estroma medio	0
18	1 mes	1+	Espesor completo	0
19	Control	1+	Tercio superior	0
20	Control	1+	Estroma medio	0

## - Microscopía electrónica de transmisión:

<i>Caso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Queratocitos</i>				<i>Estructura del colágeno</i>	
		<i>No</i>	<i>A</i>	<i>Ne</i>	<i>Total</i>	<i>Córnea</i>	<i>Esclera</i>
1	10 años	0	6	0	6	Organizado	Semiorganizado
2	10 años	0	9	0	9	Organizado	Organizado
3	10 años	0	0	1	1	Semiorganizado	Organizado
4	10 años	0	3	1	4	Organizado	Semiorganizado
5	10 años	0	5	0	5	Organizado	Semiorganizado
6	10 años	0	1	0	1	Semiorganizado	Semiorganizado
7	10 años	0	7	0	7	Organizado	Semiorganizado
8	7 años	4	3	0	7	Organizado	Organizado
9	1 año	3	0	0	3	Organizado	Semiorganizado
10	1 año	4	2	0	6	Organizado	Semiorganizado
11	9 meses	0	7	0	7	Organizado	Organizado
12	9 meses	3	5	0	8	Organizado	Organizado
13	6 meses	2	6	1	9	Organizado	Organizado
14	6 meses	10	6	0	16	Organizado	Organizado
15	3 meses	0	7	1	8	Organizado	Semiorganizado
16	3 meses	1	3	1	5	Organizado	Organizado
17	1 mes	5	1	0	6	Organizado	Organizado
18	1 mes	4	3	0	7	Organizado	Semiorganizado
19	Control	6	4	0	10	Organizado	Organizado
20	Control	10	4	0	14	Organizado	Organizado

## Anexo 7: Tablas resultados especie equina.

## - Microbiología:

Caso	Tiempo	Tejido	Cultivo directo			Cultivo enriquecido - BHB		
			AS	AMC	ASab	Turbidez	AS	AMC
1	9 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
2	9 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0
3	9 años	C	0	0	0	0	<i>Strep. β-hemolítico</i>	0
		E	0	0	0	0	<i>Strep. β-hemolítico</i>	0
4	9 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	<i>Strep. β-hemolítico</i>	0
5	8 años	C	0	0	0	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0
		E	0	0	0	+	<i>Streptococcus sp.</i>	0
6	8 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
7	8 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α y β-hemolítico</i>	0
8	8 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
9	7 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
10	7 años	C	0	0	0	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0
		E	0	0	0	0	0	0
11	7 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
12	7 años	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
13	1 año	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
14	1 año	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Streptococcus equinus</i>	0
15	1 año	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico + Staph. pseudintermedius</i>	0
16	1 año	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
17	9 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
18	9 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0

Caso	Tiempo	Tejido	Cultivo directo			Cultivo enriquecido - BHB		
			AS	AMC	ASab	Turbidez	AS	AMC
19	9 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
20	9 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
21	6 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
22	6 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
23	6 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
24	6 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
25	3 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
26	3 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	0	0	0
27	3 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
28	3 meses	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
29	1 mes	C	0	0	0	+	<i>Staph. aureus y Strep. α-hemolítico</i>	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
30	1 mes	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
31	1 mes	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. caprae y α-hemolítico</i>	0
32	1 mes	C	+	0	0	0	0	0
		E	+	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
33	Control	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0
34	Control	C	0	0	0	0	0	0
		E	0	0	0	+	<i>Strep. α-hemolítico</i>	0

- **Histología:**

<b>Caso</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Córnea</b>	<b>Localización en córnea</b>	<b>Esclera</b>
1	9 años	3+	Espesor completo	3+
2	9 años	2+	Estroma Anterior	2+
3	9 años	3+	Espesor completo	2+
4	9 años	0	-	3+
5	8 años	3+	Espesor completo	2+
6	8 años	-	-	-
7	8 años	2+	Estroma Profundo	3+
8	8 años	-	-	-
9	7 años	3+	Estroma Medio y Estroma Profundo	3+
10	7 años	1+	Estroma Profundo	4+
11	7 años	1+	Estroma Profundo	4+
12	7 años	1+	Espesor completo	4+
13	1 año	0	-	1
14	1 año	1+	Estroma Medio	1+
15	1 año	1+	Estroma Medio	0
16	1 año	1+	Estroma Profundo	1+
17	9 meses	1+	Estroma Profundo	2+
18	9 meses	1+	Estroma Profundo	1+
19	9 meses	1+	Estroma Medio	0
20	9 meses	2+	Estroma Medio	2+
21	6 meses	1+	Estroma Profundo	0
22	6 meses	1+	Estroma Medio	1+
23	6 meses	1+	Estroma Anterior y Estroma Profundo	0
24	6 meses	1+	Estroma Medio y Estroma Profundo	1+
25	3 meses	1+	Estroma Profundo	1+
26	3 meses	1+	Estroma Profundo	1+
27	3 meses	1+	Estroma Profundo	1+
28	3 meses	1+	Estroma Profundo	2+
29	1 mes	1+	Estroma Profundo	1+
30	1 mes	1+	Estroma Profundo	1+
31	1 mes	1+	Estroma Profundo	0
32	1 mes	1+	Estroma Profundo	1+
33	Control	0	-	0
34	Control	0	-	0

## - Microscopía electrónica de transmisión:

Caso	Tiempo	Queratocitos							Estructura del colágeno	
		No	PNo	A	PA	Ne	PNe	Total	Córnea	Esclera
1	9 años	1	0	7	0	0	0	8	Organizado	Organizado
2	9 años	0	0	6	0	0	0	6	Organizado	Organizado
3	9 años	0	0	2	0	0	0	2	Organizado	Semiorganizado
4	9 años	2	0	3	1	1	0	7	Organizado	Organizado
5	8 años	0	0	4	0	0	0	4	Organizado	Organizado
6	8 años	0	0	0	0	0	0	0	Organizado	Organizado
7	8 años	0	0	7	0	0	0	7	Organizado	Organizado
8	8 años	0	0	3	0	0	0	3	Semiorganizado	Semiorganizado
9	7 años	0	0	5	0	0	0	5	Organizado	Organizado
10	7 años	0	0	0	0	0	0	0	Semiorganizado	Organizado
11	7 años	0	0	4	1	1	0	6	Organizado	Semiorganizado
12	7 años	0	0	0	0	3	0	3	Organizado	Organizado
13	1 año	1	1	1	0	0	0	3	Organizado	Organizado
14	1 año	2	0	3	0	0	0	5	Organizado	Organizado
15	1 año	0	0	5	1	0	0	6	Organizado	Organizado
16	1 año	2	0	2	1	1	0	6	Organizado	Organizado
17	9 meses	6	0	0	0	1	0	7	Organizado	Semiorganizado
18	9 meses	2	0	2	2	0	0	6	Semiorganizado	Organizado
19	9 meses	3	0	7	1	0	0	11	Organizado	Organizado
20	9 meses	0	0	4	1	0	0	5	Organizado	Organizado
21	6 meses	8	0	3	0	1	0	12	Organizado	Organizado
22	6 meses	4	0	0	0	3	0	7	Organizado	Semiorganizado
23	6 meses	0	0	3	0	0	0	3	Organizado	Organizado
24	6 meses	0	0	2	0	0	0	2	Organizado	Organizado
25	3 meses	4	0	2	0	0	0	6	Semiorganizado	Semiorganizado
26	3 meses	4	0	6	0	0	0	10	Organizado	Semiorganizado
27	3 meses	0	0	4	1	0	0	5	Semiorganizado	Semiorganizado
28	3 meses	6	0	1	0	0	0	7	Organizado	Semiorganizado
29	1 mes	6	0	0	1	0	0	7	Organizado	Organizado
30	1 mes	6	0	0	0	0	0	6	Organizado	Organizado
31	1 mes	3	0	0	0	0	0	3	Organizado	Organizado
32	1 mes	2	0	0	0	0	0	2	Semiorganizado	Semiorganizado
33	Control	2	0	1	0	0	0	3	Semiorganizado	Organizado
34	Control	6	0	3	0	0	0	9	Organizado	Organizado

---

## *Referencias bibliográficas*

---

1. Murphy CJ, Samuelson DA, Pollock RVH. Chapter 21: The eye. *Miller's anatomy of the dog* 4th edition. 2013. p. 746–85.
2. Cook C. Chapter 1: Ocular embryology and congenital malformations. *Veterinary Ophthalmology* 4th edition. 2013. p. 3–38.
3. Maggs DJ. Chapter 10: Cornea and sclera. *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* 2012. p. 175–202.
4. Samuelson DA. Chapter 2: Ophthalmic anatomy. *Veterinary Ophthalmology* 4th edition. 2013. p. 39–170.
5. Ledbetter EC, Gilger BC. Chapter 18: Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. *Veterinary Ophthalmology* 4th edition. 2013. p. 976–1049.
6. Marfurt CF, Murphy CJ, Florczak JL. Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2001; **42**: 2242–51.
7. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, *et al.* Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental Eye Research* 2003; **76**: 521–42.
8. Dawson DG, Ubels JL, Edelhauser HF. Cornea and sclera. *Adler's Physiology of the Eye* 11th edition. 2011. p. 71–130.
9. Huang PT, Nelson LR, Bourne WM. The morphology and function of healing cat corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1989; **30**: 1794–801.
10. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, *et al.* Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1977; **16**: 597–613.
11. Gelatt KN, Gelatt JP. Chapter 8: Surgery of the cornea and sclera. *Small animal ophthalmic surgery: practical techniques for the veterinarian* 2001. p. 180–218.
12. Clode AB. Chapter 5: Diseases and surgery of the cornea. *Equine ophthalmology* 2nd edition. 2011. p. 181–266.
13. Ehlers N, Hjortdal J, Nielsen K. Corneal grafting and banking. *Developments in Ophthalmology* 2009; **43**: 1–14.

14. O'Neill P, Mueller FO, Trevor-Roper PD. On the preservation of corneae at -196 degrees C. for full-thickness homografts in man and dog. *The British Journal of Ophthalmology* 1967; **51**: 13–30.
15. Ehlers N, Sperling S, Olsen T. Post-operative thickness and endothelial cell density in cultivated, cryopreserved human corneal grafts. *Acta Ophthalmologica* 1982; **60**: 935–44.
16. Baddon A, Jones M, Armitage J, *et al.* A review of allograft ophthalmic tissue in eye surgery. *Cell and Tissue Banking* 2010; **11**: 29–38.
17. McColgan K. Corneal transplant surgery. *Journal of Perioperative Practice* 2009; **19**: 51–4.
18. Singh G, Singh Bhinder H. Evaluation of therapeutic deep anterior lamellar keratoplasty in acute ocular chemical burns. *European Journal of Ophthalmology* 2008; **18**: 517–28.
19. Sarnicola V, Toro P. Deep anterior lamellar keratoplasty in herpes simplex corneal opacities. *Cornea* 2010; **29**: 60–4.
20. [http://www.who.int/ethics/topics/human\\_transplant\\_report/en/](http://www.who.int/ethics/topics/human_transplant_report/en/)
21. Pena Gimenez MT, Farina IM. Lamellar keratoplasty for the treatment of feline corneal sequestrum. *Veterinary Ophthalmology* 1998; **1**: 161-3.
22. Brightman AH, McLaughlin SA, Brogdon JD. Autogenous lamellar corneal grafting in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1989; **195**: 469–75.
23. Townsend WM, Rankin AJ, Stiles J, *et al.* Heterologous penetrating keratoplasty for treatment of a corneal sequestrum in a cat. *Veterinary Ophthalmology* 2008; **11**: 273–8.
24. Norman JC, Urbanz JL, Calvarese ST. Penetrating keratoscleroplasty and bimodal grafting for treatment of limbal melanocytoma in a dog. *Veterinary Ophthalmology* 2008; **11**: 340–5.
25. Lewin GA. Repair of a full thickness corneoscleral defect in a German shepherd dog using porcine small intestinal submucosa. *The Journal of Small Animal Practice* 1999; **40**: 340–2.
26. Zhang AQ, Rubenstein D, Price AJ, *et al.* Evolving surgical techniques of and indications for corneal transplantation in Ontario: 2000 - 2012. *Canadian Journal of Ophthalmology* 2013; **48**: 153–9.

27. Borderie VM, Werthel A-L, Touzeau O, *et al.* Comparison of techniques used for removing the recipient stroma in anterior lamellar keratoplasty. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 2008; **126**: 31–7.
28. Keller WF, Blanchard GL, Kuhns EL. The clinical application of homologous corneal and scleral grafts in the dog. *Journal American Animal Hospital Association* 1973; **9**: 265–9.
29. Dice PF, Severin GA, Lumb W V. Experimental autogenous and homologous corneal transplantation in the dog. *Journal American Animal Hospital Association* 1973; **9**: 245–51.
30. Mueller FO. Short-term experiments on grafting fresh and frozen corneal tissue in dogs. *The British Journal of Ophthalmology* 1968; **52**: 752–62.
31. Hansen PA, Guandalini A. A retrospective study of 30 cases of frozen lamellar corneal graft in dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology* 1999; **2**: 233–41.
32. Hacker D V. Frozen corneal grafts in dogs and cats: a report on 19 cases. *Journal American Animal Hospital Association* 1991; **27**: 387–98.
33. Ang M, Mehta JS, Arundhati A, *et al.* Anterior lamellar keratoplasty over penetrating keratoplasty for optical, therapeutic, and tectonic indications: a case series. *American Journal of Ophthalmology* 2009; **147**: 697–702.
34. Brooks DE, Plummer CE, Kallberg ME, *et al.* Corneal transplantation for inflammatory keratopathies in the horse: visual outcome in 206 cases (1993-2007). *Veterinary Ophthalmology* 2008; **11**: 123–33.
35. Vanore M, Chahory S, Payen G, *et al.* Surgical repair of deep melting ulcers with porcine small intestinal submucosa (SIS) graft in dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology* 2007; **10**: 93–9.
36. Bussieres M, Krohne SG, Stiles J, *et al.* The use of porcine small intestinal submucosa for the repair of full-thickness corneal defects in dogs, cats and horses. *Veterinary Ophthalmology* 2004; **7**: 352–9.
37. Alexander GR, Chester Z. Use of free conjunctival grafts in horses: ten cases. *Australian Veterinary Journal* 2004; **82**: 206–10.
38. Holmberg DL. Conjunctival pedicle grafts used to repair corneal perforations in the horse. *The Canadian Veterinary Journal* 1981; **22**: 86–9.

39. Hollingsworth SR. Corneal surgical techniques. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 2003; **18**: 161–7.
40. Andrew SE, Tou S, Brooks DE. Corneoconjunctival transposition for the treatment of feline corneal sequestra: a retrospective study of 17 cases (1990-1998). *Veterinary Ophthalmology* 2001; **4**: 107–11.
41. Ollivier FJ, Kallberg ME, Plummer CE, *et al.* Amniotic membrane transplantation for corneal surface reconstruction after excision of corneolimbic squamous cell carcinomas in nine horses. *Veterinary Ophthalmology* 2006; **9**: 404–13.
42. Barros PSM, Safatle AM V, Godoy CA, *et al.* Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. *Veterinary Ophthalmology*; **8**: 189–92.
43. Barachetti L, Giudice C, Mortellaro CM. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: pilot study. *Veterinary Ophthalmology* 2010; **13**: 326–30.
44. Wilkie DA, Wolf ED. Treatment of epibulbar melanocytoma in a dog, using full-thickness eyewall resection and synthetic graft. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1991; **198**: 1019–22.
45. Dulaurent T, Azoulay T, Gouille F, *et al.* Use of bovine pericardium (Tutopatch®) graft for surgical repair of deep melting corneal ulcers in dogs and corneal sequestra in cats. *Veterinary Ophthalmology* 2014; **17**: 91–9.
46. Andrade AL, Laus JL, Figueiredo F, *et al.* The use of preserved equine renal capsule to repair lamellar corneal lesions in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology* 1999; **2**: 79–82.
47. Featherstone HJ, Renwick P, Heinrich CL, *et al.* Efficacy of lamellar resection, cryotherapy, and adjunctive grafting for the treatment of canine limbal melanoma. *Veterinary Ophthalmology* 2009; **12 Suppl 1**: 65–72.
48. Maggio F, Pizzirani S, Peña T, *et al.* Surgical treatment of epibulbar melanocytomas by complete excision and homologous corneoscleral grafting in dogs: 11 cases. *Veterinary Ophthalmology* 2013; **16**: 56–64.
49. Martin CL. Canine epibulbar melanomas and their management. *Journal American Animal Hospital Association* 1981; **17**: 83–90.
50. Toteberg-Harms M, Bredehorn-Mayr T. Preparation and use of human sclera grafts in ophthalmic surgery. *Developments in Ophthalmology* 2009; **43**: 105–8.

51. Kanai K, Kanemaki N, Matsuo S, *et al.* Excision of a feline limbal melanoma and use of nictitans cartilage to repair the resulting corneoscleral defect. *Veterinary Ophthalmology* 2006; **9**: 255–8.
52. Kawai S, Suzuki T, Kawai K. Mobility of hydroxyapatite orbital implant covered with autologous sclera. *Japanese Journal of Ophthalmology* 2000; **44**: 68–74.
53. Rai P, Lauande-Pimentel R, Barton K. Amniotic membrane as an adjunct to donor sclera in the repair of exposed glaucoma drainage devices. *American Journal of Ophthalmology* 2005; **140**: 1148–52.
54. Komuro A, Hodge DO, Gores GJ, *et al.* Cell death during corneal storage at 4 degrees C. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1999; **40**: 2827–32.
55. Andrew SE, Samuelson DA, Lewis PA, *et al.* Comparison of Optisol-GS and neomycin-polymyxin B-gramicidin ophthalmic solution for corneal storage in the dog. *Veterinary Ophthalmology* 1999; **2**: 155–61.
56. McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. *Investigative Ophthalmology* 1974; **13**: 165–73.
57. Summerlin WT, Miller GE, Harris JE, *et al.* The organ-cultured cornea: an in vitro study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1973; **12**: 176–80.
58. Crewe JM, Armitage WJ. Integrity of epithelium and endothelium in organ-cultured human corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2001; **42**: 1757–61.
59. Canals M, Costa-Vila J, Potau JM, *et al.* Morphological study of cryopreserved human corneal endothelium. *Cells, Tissues, Organs* 1999; **164**: 37–45.
60. Oh JY, Kim MK, Lee HJ, *et al.* Comparative observation of freeze-thaw-induced damage in pig, rabbit, and human corneal stroma. *Veterinary Ophthalmology* 2009; **12 Suppl 1**: 50–6.
61. Routledge C, Armitage WJ. Cryopreservation of cornea: a low cooling rate improves functional survival of endothelium after freezing and thawing. *Cryobiology* 2003; **46**: 277–83.
62. Villalba R, Pena J, Luque E, *et al.* Keratocyte injury in human corneas cryopreserved under standard conditions. *Cell and Tissue Banking* 2004; **5**: 201–4.

63. Wusteman MC, Boylan S, Pegg DE. Cryopreservation of rabbit corneas in dimethyl sulfoxide. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1997; **38**: 1934–43.
64. Feilmeier MR, Tabin GC, Williams L, *et al.* The use of glycerol-preserved corneas in the developing world. *Middle East African journal of Ophthalmology* 2010; **17**: 38–43.
65. Fong LP, Hunt CJ, Pegg DE. Cryopreservation of the rabbit cornea: freezing with dimethyl sulphoxide in air or in medium. *Current Eye Research* 1987; **6**: 569–77.
66. Halberstadt M, Bohnke M, Athmann S, *et al.* Cryopreservation of human donor corneas with dextran. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003; **44**: 5110–5.
67. Yagi T, Hardin JA, Valenzuela YM, *et al.* Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2001; **33**: 1432–40.
68. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Comparison of three methods for human corneal cryopreservation that utilize dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 1999; **39**: 47–57.
69. Canals M, Garcia J, M Potau J, *et al.* Optimization of a method for the cryopreservation of rabbit corneas: attempted application to human corneas. *Cell and Tissue Banking* 2000; **1**: 271–8.
70. Baust JM. Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preservation Technology* 2002; **1**: 17–31.
71. Laguna F, Leiva M, Costa D, *et al.* Corneal grafting for the treatment of feline corneal sequestrum: a retrospective study of 18 eyes (13 cats). *Veterinary Ophthalmology*, published online: 22 october 2014, DOI: 10.1111/vop.12228
72. Baust JM, Van B, Baust JG. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 2000; **36**: 262–70.
73. Albon J, Tullo AB, Aktar S, *et al.* Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2000; **41**: 2887–93.
74. Leist M, Nicotera P. Cell death: apoptosis versus necrosis. *Primer on Cerebrovascular Diseases* 1997. p. 101.

75. Lindquist TD, Maxwell AJ, Miller TD, *et al.* Preparation of corneal donor eyes comparing 1% versus 5% povidone-iodine. *Cornea* 2011; **30**: 333–7.
76. Albon J, Armstrong M, Tullo AB. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea* 2001; **20**: 260–3.
77. Badenoch PR, Alfrich SL, Wedding TR, *et al.* Effectiveness of a decontamination method for donor corneas. *British Journal of Ophthalmology* 1988; **72**: 225–7.
78. Morel P, Roubi N, Bertrand X, *et al.* Bacterial contamination of a cornea tissue bank: implications for the safety of graft engineering. *Cornea* 2003; **22**: 221–5.
79. Chittum ME, Grutzmacher RD, Oiland DM, *et al.* Contamination of corneal tissue from infected donors. *Archives of Ophthalmology* 1985; **103**: 802–4.
80. Tamaki K, Yamaguchi T, Varnell ED, *et al.* Histological study of corneas preserved in two new media. *The British Journal of Ophthalmology* 1987; **71**: 570–7.
81. Furiani N, Scarpella F, Martino PA, *et al.* Evaluation of the bacterial microflora of the conjunctival sac of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2011; **22**: 490–6.
82. Espinola MB, Lilenbaum W. Prevalence of bacteria in the conjunctival sac and on the eyelid margin of clinically normal cats. *The Journal of Small Animal Practice* 1996; **37**: 364–6.
83. Lilenbaum W, Nunes ELC, Azeredo MAI. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. *Letters in Applied Microbiology* 1998; **27**: 224–8.
84. Cattabiani F, Cabassi E, Allodi C, *et al.* Bacterial flora of the conjunctival sac of the horse. *Annali Sclavo; Rivista di Microbiologia e di Immunologia*; **18**: 91–119.
85. Gemensky-Metzler AJ, Wilkie DA, Kowalski JJ, *et al.* Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations. *American Journal of Veterinary Research* 2005; **66**: 800–11.
86. Moore CP, Heller N, Majors LJ, *et al.* Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *American Journal of Veterinary Research* 1988; **49**: 773–7.

87. Johns IC, Baxter K, Booler H, *et al.* Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Veterinary Ophthalmology* 2011; **14**: 195–9.
88. Leadon DP, Russell RJ, Carey B, *et al.* The putative association of alpha haemolytic streptococci with maternal mastitis and neonatal septicaemia. *Equine Veterinary Journal. Supplement* 1988; 44–5.
89. Wood JL, Burrell MH, Roberts CA, *et al.* Streptococci and Pasteurella spp. associated with disease of the equine lower respiratory tract. *Equine Veterinary Journal* 1993; **25**: 314–8.
90. Berg JN, Fales WH, Scanlan CM. Occurrence of anaerobic bacteria in diseases of the dog and cat. *American Journal of Veterinary Research* 1979; **40**: 876–81.
91. Pfaller MA, Herwaldt LA. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 1988; **1**: 281–99.
92. Buma R, Maeda T, Kamei M, *et al.* Pathogenic bacteria carried by companion animals and their susceptibility to antibacterial agents. *Biocontrol Science* 2006; **11**: 1–9.
93. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. 2008. p. 951
94. Shimmura-Tomita M, Shimmura S, Satake Y, *et al.* Keratoplasty postoperative treatment update. *Cornea* 2013; **32 Suppl 1**: S60–4.
95. Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius isolated from various animals. *The Canadian Veterinary Journal* 2011; **52**: 153–7.
96. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 2013. p. 874.
97. Moussa M, Dumont F, Perrier-Cornet J-M, *et al.* Cell inactivation and membrane damage after long-term treatments at sub-zero temperature in the supercooled and frozen states. *Biotechnology and Bioengineering* 2008; **101**: 1245–55.
98. Freeman BA, Burrows W. Burrows Textbook of Microbiology. 1985. p. 1038.
99. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 2010. p. 955-61.

100. Voelter-Ratson K, Monod M, Unger L, *et al.* Evaluation of the conjunctival fungal flora and its susceptibility to antifungal agents in healthy horses in Switzerland. *Veterinary Ophthalmology* 2014; **17 Suppl 1**: 31–6.
101. Verneuil M, Durand B, Marcon C, *et al.* Conjunctival and cutaneous fungal flora in clinically normal dogs in southern France. *Journal de Mycologie Médicale* 2014; **24**: 25–8.
102. Shewen PE, Povey RC, Wilson MR. A survey of the conjunctival flora of clinically normal cats and cats with conjunctivitis. *The Canadian Veterinary Journal* 1980; **21**: 231–3.
103. Hay RJ, Moore MK. Mycology. *Rook's Textbook of Dermatology*. 2004. p. 1405–506.
104. Kanerva L. Handbook of Occupational Dermatology. 2000. p. 191
105. Desai SA, Minai OA, Gordon SM, *et al.* Coccidioidomycosis in non-endemic areas: a case series. *Respiratory Medicine* 2001; **95**: 305–9.
106. Armitage WJ, Dick AD, Bourne WM. Predicting endothelial cell loss and long-term corneal graft survival. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003; **44**: 3326–31.
107. Lacerda RP, Peña MT, Laguna F, *et al.* Corneal grafting for the treatment of full-thickness corneal defects in dogs: A review of 48 cases. *European College of Veterinary Ophthalmologists 2013 Annual Scientific Meeting* 2013. p. 31.
108. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, *et al.* In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 1995; **21**: 1465–8.
109. De Torres C, Munell F, Ferrer I, *et al.* Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Neuroscience Letters* 1997; **230**: 1–4.
110. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995; **7**: 61–4.
111. Yasuda M, Umemura S, Osamura RY, *et al.* Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. *Archives of Histology and Cytology* 1995; **58**: 185–90.

112. Furthmayr H, Timpl R. Immunochimistry of collagens and procollagens. *International Review of Connective Tissue Research* 1976; **7**: 61-99.
113. Ashwood-Smith MJ, Morris GW, Fowler R, *et al.* Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Human Reproduction (Oxford, England)* 1988; **3**: 795–802.
114. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 1996; **17**: 243–56.
115. Dubielzig RR, Ketring KL, McLellan GJ, *et al.* Chapter 4: Surgical trauma and iatrogenic lesions. *Veterinary Ocular Pathology*. 2010. p. 59-76.