



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio clínico de la queratoconjuntivitis seca canina:
diseño y validación de un sistema de gradación y
respuesta al tratamiento con células madre
mesenquimales**

**Dña. Eva Giménez Mainer
2021**

Hace cinco años que empecé este increíble camino cuyo fin conlleva a la defensa de tu tesis doctoral. Han sido años duros de compaginar trabajo diario en consulta, largas noches de urgencias, horas de investigación y ordenador; además de seguir formándome en esta increíble especialidad que es la oftalmología.

Parecía imposible alcanzar dicha meta, pero por fin ha llegado el día, y quiero agradecer a todas aquellas personas que han estado ahí apoyándome.

A **Alejandro Bayón**, que no solo ha sido mi director de tesis, sino mi mentor a lo largo de todos estos años. Estaré siempre agradecida por darme esta oportunidad cuando era solo una recién licenciada y por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos.

A mi codirector **Jesús Talavera**, por querer ser partícipe de este bonito proyecto. Gracias por tu dedicación, trabajo, constancia y sobre todo paciencia conmigo.

A **Jesús. I. Gil Chinchilla** por todo el trabajo de preparación y elaboración, además de su apoyo a lo largo de todo este proceso. Sigue con esa gran ambición. Así como a la Unidad de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria-Arrixaca por su colaboración a lo largo de este proyecto. A **Mayte Escobar** por todas las horas compartidas en el hospital, además de sacar parte de su tiempo para ayudarme en este proyecto.

Mi **familia**, por estos años separados en los que no hemos podido compartir tantos momentos. Todo este esfuerzo es para vosotros, por estar siempre apoyándome. Espero que estéis orgullosos de todo lo que hago.

A **Amaya Segarra** por todos estos años compartidos. Han sido muchas vivencias juntas y espero de verdad volver a encontrarnos. Siempre estaré agradecida por todo el cariño que hemos compartido.

Carlos Micó con quien comparto la pasión por la oftalmología. Gracias por acogerme cuando llegue a Murcia, por tu dedicación y cariño a lo largo de los años. Has sido como un hermano mayor al que he podido consultar todas mis dudas e inquietudes. A todos mis compañeros del hospital, con los que tantas horas he compartido durante el día a día y las largas noches de urgencias; y que se ha convertido en mi segunda casa. Mencionar a **Patricia Sebastián**, quién nos iba a

decir que volveríamos a encontrarnos en Murcia después de tanto tiempo. Gracias por tu apoyo, consejos y por hacer más amenas las tardes en el despacho. A **Carmen Ródenas** por su naturalidad y alegría; contigo es imposible tener malos días y momentos para aburrirse. **Juani Carrillo** por su inconfundible risa y por haberme aguantado desde mis inicios allá por el 2012. Espero que esta amistad perdure muchos años más. Tampoco olvidar a los numerosos compañeros que han pasado a lo largo de estos años, de los cuales guardo un gran recuerdo y a los que espero volver a ver pronto como **María López, Patricia Leal, Mila Hernández, Fran Membiela, María Cascales, Miriam Martínez, Giorgia Santarelli y José María Rodríguez**. Y a todo el profesorado del hospital que ha contribuido a mi formación y a ser la profesional que soy ahora.

No olvidar tampoco a mis compañeros de despacho, **Damián Escribano, Alberto Muñoz, Laura Castilla y Marianna Battista**. Han sido muchas horas de ordenador, cafés y tertulias. El tiempo ha sido mucho más ameno con vosotros al lado.

A **Patri y Pepe** por ser un gran apoyo fuera del mundo hospitalario, además de unirme una gran amistad con muchos momentos compartidos y de la cual estoy muy agradecida. Y por último a mis amigos de Zaragoza que llevan tantos años a mi lado, y aunque no podamos vernos tan a menudo, siempre están cuando se les necesita.

Abreviaturas

- AA: aminoácidos
- Ach: acetilcolina
- AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
- AQP: acuaporinas
- CD: cúmulo de diferenciación
- CKCS: Cavalier King Charles Spaniel
- CM: células madre
- CMA: células madre adultas
- CME: células madre embrionarias
- CMM: células madre mesenquimales
- CMPi: células madre pluripotentes inducidas
- COX2: ciclooxigenasa 2
- CpN: ciclofilina
- DAG: diacilglicerol
- EGF: factor de crecimiento epidermal
- FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos
- GC: guanilciclase
- HGF: factor de crecimiento hormonal
- IDO: indoleamina dioxigenasa
- IFN: interferón
- IK_{Ca}1: canales específicos de K⁺ de conductancia intermedia dependiente de calcio
- IL: interleuquina
- IP₃: inosito 1,4,5 trifosfato

- MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
- NOD: no obeso diabético
- NPY: neuropéptido Y
- PGE2: prostaglandina
- PKA: proteína quinasa A
- PKC: proteína quinasa C
- QCS: queratoconjuntivitis seca
- SS: síndrome de Sjögren
- STT: test de Schirmer
- TC: grupo terapia celular
- TGF: factor de crecimiento tumoral
- TM: grupo terapia médica
- TNF: factor de necrosis tumoral
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
- VIP: péptido intestinal vasoactivo
- WHWT: West Highland White Terrier

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1. EMBRIOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA LACRIMAL	9
1.1. Embriología	9
1.2. Aspectos macroscópicos y microscópicos	9
1.3. Vascularización e inervación	10
2. COMPONENTES DE LA PELÍCULA LACRIMAL PRECORNEAL	13
2.1. Fase lipídica	14
2.2. Fase acuosa	15
2.3. Fase mucosa	18
2.4. Glicocalix	20
3. FISIOLOGÍA DE LA PELÍCULA LACRIMAL	20
3.1. Fase mucosa: regulación de la producción de mucina, secreción de electrolitos y agua	20
3.2. Fase acuosa: regulación de la secreción proteica, electrolitos y agua junto con la actividad neural	23
3.3. Fase lipídica: regulación neural y hormonal	25
4. QUERATOCONJUNTIVITIS SECA EN LA ESPECIE CANINA	26
4.1. Etiopatogenia	27
4.2. Signos clínicos	29
4.3. Técnicas diagnósticas	30
4.4. Tratamiento	31
5. TERAPIA CON CÉLULAS MADRE	32
5.1. Conceptos y generalidades	32

5.2. Terapia en medicina veterinaria.....	34
6. SISTEMAS DE ESTADIFICACIÓN CLÍNICA EN.....	35
MEDICINA VETERINARIA	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1. MATERIALES.....	39
1.1. Animales.....	39
1.2. Aparataje y material accesorio.....	39
2. METODOS.....	40
2.1. Elaboración del sistema de estadificación clínica.....	40
2.2. Diseño experimental.....	43
2.3. Obtención y preparación de las dosis celulares.....	44
2.4. Administración de la terapia con células madre.....	45
2.5. Recogida de datos.....	46
2.6. Análisis estadístico.....	47
RESULTADOS.....	51
1. Fiabilidad y concordancia de la escala clínica.....	53
2. Estudio terapéutico: población de estudio.....	57
3. Análisis en el día de inclusión.....	58
3.1. Grupo terapia celular.....	58
3.2. Grupo terapia médica.....	59
3.3. Correlaciones de variables en ambas poblaciones.....	60
4. Análisis de cada variable a lo largo de los diferentes puntos de control.....	62
5. Análisis de comparación entre grupos de tratamiento.....	74

DISCUSIÓN	87
1. Validación de la escala clínica para la gradación de pacientes con QCS.....	89
2. Protocolo de tratamiento con células madre.....	92
3. Estudio terapéutico: resultados generales.....	95
4. Análisis de la eficacia de la terapia médica.....	97
5. Análisis de la eficacia de la terapia celular.....	100
6. Análisis comparativo de la eficacia de la terapia celular vs médica.....	104
7. Limitaciones del estudio.....	107
 CONCLUSIONES	 109
 BIBLIOGRAFÍA	 113
 RESUMEN	 139
 SUMMARY	 143

Introducción

En *medicina humana*, la queratoconjuntivitis seca (QCS) afecta a millones de personas a nivel mundial, representando una de las enfermedades más comunes de la superficie ocular.¹ Actualmente es padecida por un 5 a 37% de la población de 50 años o superior; que va incrementando con la edad, y suponiendo costes anuales elevados, como por ejemplo 3.84 millones de dólares en Estados Unidos.^{2,3} Aunque según estudios, entre el 2000 y el 2050 el número de personas entre 65-84 años que padecerán ojo seco se incrementará un 100%, llegando hasta 333% en los mayores de 85 años.⁴ Tendencias similares se espera también en otras partes del mundo.⁵

El impacto del ojo seco sobre la calidad de vida se mide por los síntomas de dolor e irritación, el efecto en la salud ocular y el cómo afecta a la capacidad visual, ya que actividades cotidianas como el conducir o leer se ven limitados.⁶ Estos pacientes también se ven afectados por la necesidad constante de aplicación del tratamiento médico, como por ejemplo lágrimas artificiales, y su coste a largo plazo, ya que requiere de un tratamiento crónico.

La definición de QCS ha ido variando a lo largo del tiempo, ya que inicialmente se consideraba un desorden de la película lacrimal debido a una deficiencia o excesiva evaporación, lo que causaba un daño en la superficie ocular, estando asociado a signos de malestar ocular. Posteriormente, en 2007 la Sociedad de la Película Lacrimal y Superficie Ocular describió ojo seco como una enfermedad multifactorial de la lágrima y superficie ocular, que da lugar a síntomas de incomodidad, problemas visuales e inestabilidad en la película lacrimal, con un potencial daño sobre la superficie ocular. Además, esta acompañado de un incremento en la osmolaridad de la película lacrimal. Diez años más tarde, esta misma sociedad ha modificado la definición a ser una enfermedad multifactorial de la superficie ocular que se caracteriza por la pérdida de homeostasis en la película lacrimal y que se acompaña de signos oculares, en donde la inestabilidad e hiperosmolaridad de la lágrima, inflamación y daño de la superficie ocular y anomalías neurosensoriales juegan un papel etiológico.^{2,7,8}

En *medicina veterinaria* el primero en publicar sobre la presencia en la especie canina fue el profesor Lloyd Helper en 1976, en los que observó una reducción del componente acuoso de la lágrima. Para ello la herramienta estándar de medición fue el Test de Schirmer (STT) junto con la presencia de alteraciones en la

superficie ocular.⁹ El test de Schirmer I se desarrolló en 1903 por el oftalmólogo alemán Otto Schirmer, el cual requiere de 60 segundos realizarlo, pero que sin embargo ofrece conocimiento sobre la lagrime basal y refleja junto con la vía neural.^{10,11}

Los signos clínicos varían dependiendo de la cronicidad de la enfermedad, observándose descarga ocular e hiperemia conjuntival en los estadios tempranos, y progresando la queratitis hasta visualizarse vascularización, edema y pigmento sobre la superficie corneal, llegando incluso hasta la ulceración.¹² En *medicina humana* la gravedad de estos signos clínicos originó la creación de una escala clínica, la cual ha permitido dar unas pautas de tratamiento y de seguimiento en función de la severidad de la enfermedad.² En el caso de la queratoconjuntivitis seca canina no existe una escala clínica tal y como se encuentra especificada en humana.

El tratamiento médico para la deficiencia en la película lacrimal va principalmente dirigido a mitigar los signos de la superficie ocular y aumentar el bienestar del paciente. Drogas como los inmunosupresores han demostrado un incremento de la producción lacrimal y una disminución de los signos inflamatorios; pero que a lo largo de los años se ha demostrado que no en todos los pacientes se observaba mejoría, lo que ha llevado a búsqueda de nuevos productos alternativos.^{13,14}

El nombre genérico de “célula madre” (CM) hace referencia a cualquier célula no especializada que es capaz de renovarse a través de la división celular, pero que puede dar lugar *a posteriori* a una célula especializada y funcional. Se encuentran dos tipos celulares, por un lado las embrionarias y por otro las adultas, las cuales se pueden obtener de una gran variedad de tejidos. Actualmente las adultas se denominan células madre mesenquiales (CMM) y se caracterizan por ser capaces de modular la respuesta inmune. Dentro de esta propiedad destaca la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos y citoquinas, suprimir la función de las células dendríticas y disminuir la producción de interferón γ por las *natural killer*.¹⁵ Aparte de este efecto directo sobre el sistema inmune, se modula también el microambiente, mitigando la respuesta inflamatoria dañina.¹⁶

Es por ello que la queratoconjuntivitis seca canina de origen inmunomediado es una potencial candidata para el tratamiento con células madre. En ella se ha

observado un aumento de células T y B con infiltración a nivel acinar, además de la liberación de citoquinas proinflamatorias que promueven un mayor daño sobre el tejido glandular.^{9,17,18}

En *medicina veterinaria* la mayoría de las publicaciones se limitan a casos clínicos aislados, serie de casos o estudios no controlados¹⁹, encontrando varias publicaciones en queratoconjuntivitis seca canina^{20,21} pero en las cuales no se ha comparado con el tratamiento tópico convencional. Además, al contrario que ocurre en medicina humana, en veterinaria no existe una legislación específica vigente que las regule.^{22,23}

Por todo ellos los objetivos del estudio son:

- Establecer una escala clínica para permitir clasificar a la población con queratoconjuntivitis seca inmunomediada en 4 estadios, en función de su severidad.
- Validar la fiabilidad y concordancia de dicha escala entre observadores.
- Administrar células madre mesenquimales en la glándula orbital y de la membrana nictitante de pacientes con queratoconjuntivitis seca inmunomediada.
- Analizar la evolución de los signos clínicos a lo largo de un año de los animales que solo recibieron tratamiento médico y compararlo con los descritos en la bibliografía.
- Analizar la evolución de los signos clínicos a lo largo de un año de los animales que recibieron tratamiento celular y compararlo con los descritos en la bibliografía.
- Comparar ambas terapias entre sí, para determinar si las CMM son una opción como tratamiento adyuvante para la queratoconjuntivitis seca inmunomediada en animales que presentan cronicidad.



Revisión bibliográfica

1. EMBRIOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA ORBITAL Y DE LA MEMBRANA NICTITANTE

1.1 Embriología

Los párpados se desarrollan a partir del ectodermo superficial, el cual junto con el mesodermo y el endodermo forman las tres capas germinativas embrionarias. Más concretamente, el párpado superior se origina del proceso frontonasal y el inferior junto con la membrana nictitante del proceso maxilar.

La dermis y el tarso de los párpados se originan de la cresta neural mesenquimal y tiene lugar en el día 30 de gestación en la especie canina.

El ectodermo, además de originar la conjuntiva palpebral que tapiza a los párpados, también contribuye al desarrollo de la epidermis, cilios, glándula lacrimal principal y glándulas de Meibomio, Zeiss y Moll entre otras estructuras.^{24,25}

En el ser humano la formación de la glándula lacrimal principal tiene lugar en la conjuntiva del fondo de saco superoexterno, en donde se produce una condensación mesenquimatoso alrededor de las yemas epiteliales sólidas para formar dicha glándula secretora.²⁶ Este proceso se inicia en la fase embrionaria de 25 mm y el desarrollo completo de la glándula se produce a los 3-4 años de la vida extrauterina.²⁷

1.2 Aspectos macroscópicos y microscópicos

La glándula lacrimal canina principal es una estructura plana, no encapsulada, lobulada, de aspecto rosáceo y que muestra variaciones morfológicas en función de la raza. La forma puede variar desde redondeada, triangular, oval y con forma de corazón. Se localiza en en la zona superotemporal del globo ocular, por debajo del ligamento orbitario y entre el músculo dorsal y el recto lateral. Se encuentra rodeada de grasa intraorbitaria a excepción de su cara dorsal y ventral, y presenta un tejido conectivo que la conecta con el ligamento orbitario (superior) y con la cápsula de Tenon (inferior).²⁸

La glándula de la membrana nictitante o tercer párpado se localiza en la base de dicha membrana y se encuentra rodeando distalmente el cartílago en forma de T

que conforma al tercer párpado. Su secreción en el perro es seromucosa y su cara bulbar se encuentra cubierta por un tejido linfoide.²⁸

Existen variaciones entre las diferentes razas en su tamaño y peso. Los Beagles presentan glándulas lacrimales de menor tamaño, mientras que en Pit bull terrier son de mayor volumen. El peso se ha evaluado en el Pit bull y cruce de Pointer en donde no se aprecian diferencias significativas entre ellos, con un peso medio de 348,2 mg y 283 mg respectivamente.²⁸

La glándula de la membrana nictitante ha podido ser estudiada en el Pit bull observándose que es ligeramente mas ancha con una media de 11,7 mm de grosor y un peso medio de 266,3 mg.²⁸

Ambas glándulas se componen histológicamente de: parénquima, estroma, acini, túbulos, conductos intra e interlobulares, tejido conectivo intra e interlobular, vasos sanguíneos intra e interlobulares, células mioepiteliales, infiltrados celulares y células adiposas intra e interlobulares.

Están constituidas por unidades túbulo-acinares, en donde los acini se organizan alrededor de los segmentos tubulares.

El intersticio esta compuesto por fibras de colágeno que separan los lóbulos glandulares, células mioepiteliales, plasmáticas y linfocitos. También se ha demostrado la existencia de inclusiones adiposas intra e interlobulares tanto en la glándula principal como de la membrana nictitante.²⁹

1.3 Vascularización e inervación

La glándula lacrimal principal se nutre de la arteria lacrimal, que surge de la rama de la arteria oftálmica externa, cerca del ápex del cono de los músculos extraoculares. Transcurre a lo largo de la cara lateral del recto lateral, entrando a la glándula aproximadamente por el centro de su borde posterior. El drenaje venoso es llevado a cabo por la vena lacrimal, que se encuentra adyacente a la arteria, transcurriendo a lo largo del borde ventral hasta alcanzar el plexo orbital venoso en la base de la órbita.²⁸

La inervación de la glándula lacrimal esta mediada por la vía aferente compuesta por la división oftálmica del V par craneal, el ganglio trigémino y el núcleo principal del V par craneal.

En la vía aferente se capta un estímulo sobre la conjuntiva o la córnea, y mediante el nervio lacrimal, que es una rama de la división oftálmica del trigémino (par craneal V) llega al ganglio trigémino. De ahí se conecta mediante interneuronas al núcleo lacrimal del nervio facial situado en el metencéfalo.

En el ser humano existe una conexión entre el hipotálamo y el núcleo lacrimal, generando las lágrimas emocionales y también con el sistema olfatorio, explicando así el por qué de las lágrimas en presencia de comida picante.^{30,31}

La vía eferente se divide en simpático y parasimpático.³² La inervación simpática se inicia en el ganglio cervical craneal (simpático), uniéndose al nervio maxilar y que se continua con el zigomático y zigomático-temporal hasta alcanzar la glándula lacrimal. Una vez alcanzada la glándula se distribuye por la musculatura lisa de los vasos, los acini y los conductos. La inervación simpática libera norepinefrina y neuropéptido Y, cuyos receptores se localizan en las células acinares. Su estimulación favorece el riego sanguíneo a la glándula y activa la vía de proteínas G, lo que contribuye a una mayor secreción de lágrima.^{30,33}

La inervación parasimpática se divide en preganglionar y postganglionar. La preganglionar se origina del núcleo superior salivatorio y viaja junto con el nervio facial (par craneal VII) hasta alcanzar el ganglio pterigopalatino. Las fibras postganglionares se unen a la división maxilar del nervio trigémino y viajan hasta alcanzar la rama cigomática dividiéndose en el nervio cigomático-facial y cigomático-temporal (ZTN).³⁴ En la especie canina se han indicado tres variaciones del curso del nervio lacrimal y cigomático-temporal hasta alcanzar la glándula lacrimal. En un 60,6 % de los animales del estudio no había comunicación entre el nervio lacrimal y ZTN, ya que ambos comunican directamente con la glándula (Fig 1.1). En un 36,4 % el nervio lacrimal y ZTN entran directamente a la glándula, pero al mismo tiempo hay una comunicación entre ellos que presenta pequeñas ramificaciones que entran en la glándula (Fig 1.2). Y en un pequeño porcentaje (3%), ZTN no tiene una rama directa y comunica con el nervio lacrimal antes de que este entre a la glándula (Fig 1.3).³⁵

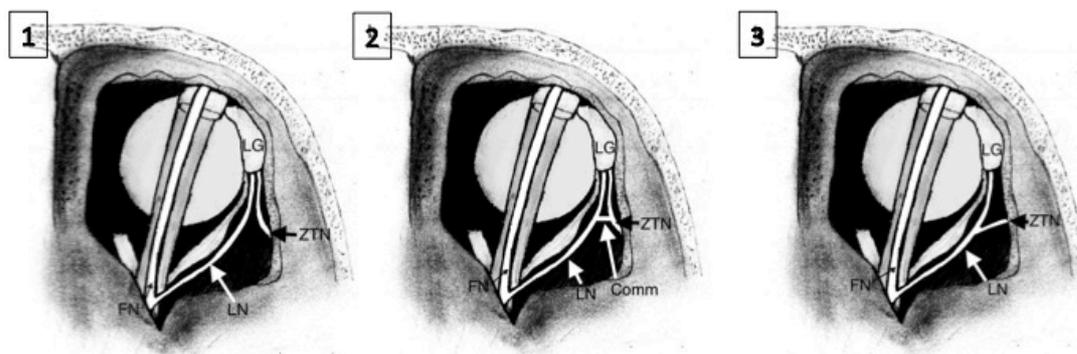


Figura 1: Variaciones del curso del nervio lacrimal y cigomático. LG= glándula lacrimal, LN= nervio lacrimal, FN= nervio frontal, ZTN= nervio cigomático-temporal, Comm= comunicación. En Scott G et al, 2014.³⁵

Las fibras al llegar a la glándula inervan las células acinares, la de los conductos y la pared de los vasos vasculares regulando así la secreción de agua, electrolitos y proteínas a través de la vía de la proteína G y del Ca^{2+} /calmodulina y que esta mediado por la liberación de acetilcolina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP).^{30,36} M_3AChR es el único receptor muscarínico en la glándula lacrimal, mientras que para VIP se localizan dos tipos de receptores; VIPAC1 en las células acinares y VIPAC 2 en las mioepiteliales.³⁷

La secreción de la glándula lacrimal es inhibida por el neuropéptido Leu-Enkephaline (L-Enk), el cual interactúa con la proteínas G inhibitorias, interfiriendo así la activación de la ciclase de adenilato, mediada por las proteínas G activadoras.³⁶

Las fibras parasimpáticas postganglionares inervan también las glándulas nasales mediante el nervio nasal caudal, que procede de la rama maxilar del nervio trigémino. Esto genera la estimulación de la producción lacrimal cuando hay una exposición a ciertos olores, como en el caso de los felinos con el alcohol.³⁴

Con respecto a la glándula nictitante, no esta claro su inervación parasimpática y se presupone que el nervio cigomático y el infraorbital son los que le transmiten las fibras simpáticas.³⁴

2. COMPONENTES DE LA PELÍCULA LACRIMAL PRECORNEAL

La lagrime presenta un gran número de funciones tales como proteger la córnea de la desecación y lubricar los párpados, mantener el estado refractivo de la córnea, protegerla frente a infecciones mediante sustancias antimicrobianas específicas y no específicas, aportar oxígeno, nutrientes y transportar productos metabólicos, evitar la deshidratación debido a su hiperosmolaridad, eliminar cuerpos extraños de la córnea y conjuntiva y proveer de células inmunes.³⁰

Tradicionalmente la lágrima se componía de tres fases: la lipídica, acuosa y la de mucina, pero en los últimos años se ha descrito una cuarta fase, el glicocalix, que se extiende sobre la superficie de la córnea.³⁷ Aunque se tiene conocimiento de estas fases o capas de la lágrima, no existe una delimitación o corte exacto entre ellas, sino que se encuentran entremezcladas entre si (Fig.2).^{38,39}

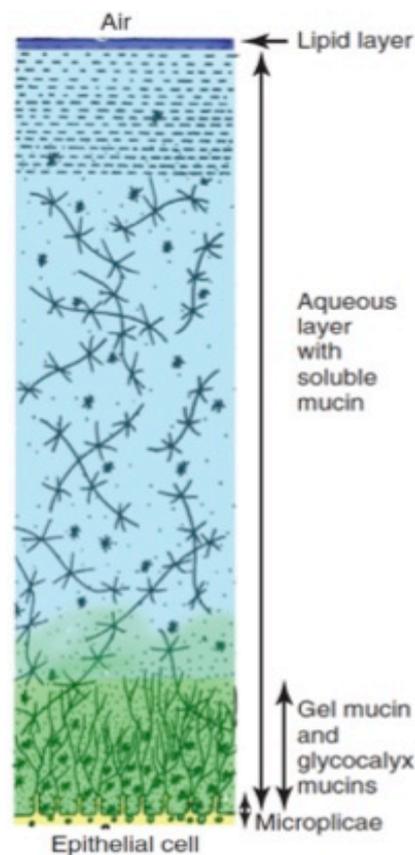


Figura 2: La película lacrimal precorneal. Modificado de Bron AJ et al, 2004.³⁹

El grosor de la lágrima se ha estimado en el ser humano de $3,4 \pm 2,6 \mu\text{m}$ ³⁷, y a medida que va avanzando la tecnología en técnicas diagnósticas, tales como la tomografía óptica computerizada, se cree que se podrá llegar a diferenciar entre el grosor central de la película lacrimal y de la situada en la carúncula (menisci) del párpado superior e inferior.⁴⁰ En el caso de medicina veterinaria se necesitan más estudios en las diversas especies para llegar a un consenso sobre el grosor de la película lacrimal.

El pH en el ser humano varia de 7,14-7,82³⁰ y en el caso del perro, los resultados obtenidos en el estudio de Beckwith-Cohen y colaboradores muestran unos valores de $8,05 \pm 0,26$.⁴¹ También se evaluaron en otras especies como en el vacuno y en la equina, donde los valores obtenidos fueron de $8,32 \pm 0,14$ y de $7,84 \pm 0,30$ respectivamente.⁴¹

2.1 Fase lipídica

La fase **lipídica** es secretada por las glándulas de Meibomio, las cuales se encuentran muy desarrolladas en el perro y que se pueden encontrar entre 20 y 40 glándulas por párpado.⁴² Se localizan dentro de la placa tarsal, donde forman agregados lineales de acini secretores, los cuales se abren a unos conductos centrales que se disponen en ángulo recto respecto al margen de los párpados. Así pues, la fase lipídica se distribuye por la superficie de los párpados hacia la unión mucocutánea a través de pequeñas aperturas⁴², las cuales forman una línea en el margen del párpado conocida como “línea gris”. La disposición de los acini puede llegar a observarse a través de la conjuntiva palpebral semitransparente.

Las características histológicas de estas glándulas es que son holocrinas, sebáceas modificadas y que se disponen de forma lineal dentro del tejido conectivo del margen palpebral.¹² La fase lipídica tiene un grosor aproximado de $0,1 \mu\text{m}$, retarda la evaporación y permite una buena distribución de la lágrima sobre la superficie de la córnea.⁴³ Su composición consiste en ácidos grasos monoinsaturados, ésteres de esteroides, hidrocarburos, triglicéridos, diglicéridos, esteroides libres (colesterol), ácidos grasos libres y lípidos polares (fosfolípidos).³⁷

Los lípidos de las glándulas se encuentran en un estado líquido a temperatura corporal, y eso es debido a que su peso es mayor y su polaridad menor que la de la

grasa.⁴⁴ La interacción entre los lípidos y las proteínas de la fase acuosa de la película lacrimal dan lugar a un gel viscoelástico no colapsante, y que ha sido comparado con la sustancia surfactante pulmonar. A pesar de la diferencia en la composición de los lípidos, lo que genera una estructura lipídica distinta, ambos se comportan de una manera similar disminuyendo la tensión superficial entre la interfase aire-agua y así se evita el colapso alveolar y la evaporación de la lágrima durante el ciclo de compresión-expansión tanto en la respiración como en el parpadeo.^{45,46}

Entre las técnicas para cuantificar la secreción de las glándulas se ha usado la meibometría no invasiva en perros conscientes, donde los resultados han sido variables, con un valor de 179 ± 60 unidades Meibometers (MU) y sin observarse diferencias en la edad y el sexo de la población canina estudiada.⁴⁷ En el estudio de Benz realizaron medidas tanto en el ojo derecho e izquierdo, que fueron de 211 ± 48 MU y 205 ± 41 MU respectivamente y al igual que en el estudio anterior, no observaron diferencias entre el sexo de la población.⁴⁸

2.2 Fase acuosa

La fase **acuosa** es secretada por la glándula lacrimal orbital y por la de la membrana nictitante y esta constituida por 98,2% de agua y un 1,8% de sustancias sólidas.

Permite suplir las necesidades metabólicas (glucosa, electrolitos, oxígeno y agua) de las córneas avasculares, elimina dióxido de carbono y ácido láctico, además de detritus y bacterias de la superficie ocular, manteniendo una buena lubricación de la córnea, conjuntiva y membrana nictitante.¹²

Entre los componentes sólidos encontramos electrolitos, glucosa, urea, polímeros surfactivos, glicoproteínas y proteínas. Actualmente se ha detectado 125 tipos diferentes de proteínas en la película lacrimal de perros sanos donde destacan las globulinas (IgA, IgG, IgM), albúminas, complemento, lisozimas, lactoferrina, lipocalin y factor de crecimiento epidermal (EGF), lacritin e interleukinas (Fig.3).^{37,49,50,51,52}

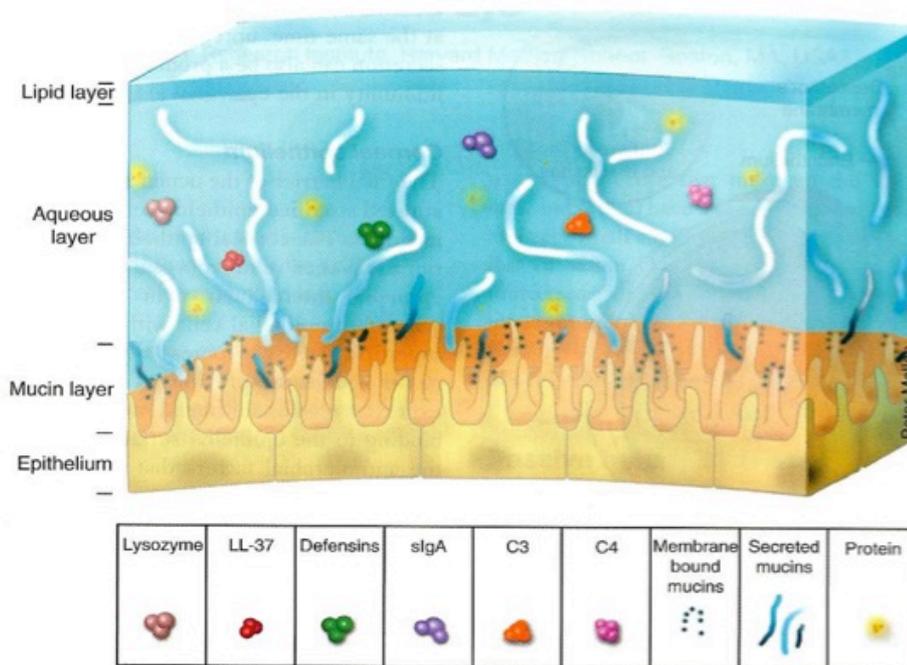


Figura 3: Componentes de la película lacrimal. En Gregory MS, 2010.⁵²

En humanos, bóvidos y conejo la concentración de electrolitos en la película lacrimal es similar a la del plasma, a excepción del potasio, que es de tres a seis veces más abundante en la lágrima, indicándonos así un mecanismo de transporte activo.⁵³

El nivel de proteínas en la lágrima de los perros es de 0,35 g/dl, donde las más destacadas son las globulinas, albuminas y lisozimas con un 93%, 4% y 3% respectivamente.⁵⁴ Las lisozimas junto con la lactoferrina, α -lisina y proteínas de complemento son consideradas como sustancias antimicrobiales no específicas.^{55,56}

La lisozima se encuentra en la mayoría de los mamíferos, aves e insectos, pero no se ha detectado en vacuno ni en felinos. En comparación con los humanos y los primates, los animales domésticos tienen una concentración menor, como en el caso del caballo que puede llegar a presentar la mitad de la concentración de lisozima de un humano.^{57,58} Son secretadas por la glándula lacrimal, y su concentración aumenta en caso de conjuntivitis, considerándolas la primera línea de defensa contra patógenos oculares.^{54,55} Actúan generando bacteriolisis mediante la hidrólisis de los peptidoglicanos, los cuales forman la pared celular de las bacterias. También presentan acción antifúngica gracias a las enzimas hidrolíticas, como la quitinasa.⁵⁵

La α -lisina causa la ruptura de las membranas celulares por un mecanismo desconocido. También se desconoce su origen en la película lacrimal, pero se ha detectado que su concentración es mayor en ese medio que en el suero, plasma y humor acuoso en el caso del ser humano.⁵⁹

La lactoferrina se ha identificado en humanos, vacuno y otros mamíferos. Es secretada por la glándula lacrimal principal y presenta una alta concentración en la película lacrimal, de 65 a 160 mg/ml.^{55,60} Su forma de actuación es mediante la unión reversible a dos átomos de hierro, agotando el hierro esencial para el metabolismo y crecimiento de las bacterias⁶¹, además de ser capaz de realizar sinergia con IgA, Ig G y complemento, modulando así el sistema inmune.⁶²

Las sustancias específicas son IgA, IgG e IgM cuya concentración varía en función de la edad y momento del día. La IgA es considerada la primera inmunoglobulina en la película lacrimal y es secretada por las células plasmáticas localizadas en el intersticio de dicha glándula, así como en la sustancia propia de la conjuntiva.⁵⁵ Su concentración en humana es de 10 a 80 mg/dl, además de ser mayoritaria frente a la IgG e IgM.^{63,64} Su estructura difiere con la IgA del suero, ya que esta presenta una cadena en forma de J, a la cual se le unen dos moléculas de IgA, lo que le confiere protección frente a las enzimas proteolíticas de las lágrimas.⁶²

Su acción es la de proteger al ojo frente a las infecciones víricas, colonización bacteriana e infestación por parásitos. Para ello, forman inmunocomplejos que aglutinan y neutralizan.^{55,64} IgG e Ig M se encuentran en concentraciones más bajas en la película lacrimal. La producción de IgM tiene lugar durante la infección primaria mientras que IgG durante la re-exposición a un microorganismo. Ambas activan la cascada del complemento y promueven la fagocitosis.^{55,63,65}

En la fase acuosa también se encuentran proteinasas e inhibidores de las proteinasas, las cuales juegan un papel importante en la inmunidad ocular y en la prevención de la excesiva degradación de los tejidos sanos oculares. Las más destacadas son MMP-2 secretada por los queratocitos y MMP-9 por las células epiteliales corneales o por los neutrófilos tras una lesión corneal, aumentando su concentración en la película lacrimal tras queratitis ulcerativas.^{66,67}

La contribución de cada glándula a la fase acuosa se ha estudiado a lo largo de los años, viéndose que el volumen de fluido producido por cada una de ellas varía

dependiendo los animales. Los estudios muestran que cuando una de las glándulas es eliminada, se produce un incremento compensatorio en la producción de lágrima por la otra que permanece y en el caso de la eliminación de ambas glándulas se produce una total ausencia de secreción, sugiriendo así que las glándulas accesorias conjuntivales no están presentes en el perro o tienen un papel poco relevante.^{68,69}

El porcentaje de afección a la producción lacrimal se ha estimado en un 23 a 46% en caso de destrucción de la glándula lacrimal orbital y en un 12 a 26% en el caso de la glándula de la membrana nictitante.³⁰

En algunas especies como en ciertos mamíferos, aves, reptiles y anfibios se encuentra la glándula de Harderian, contigua a la membrana nictitante y que contribuye también en la lubricación de la superficie ocular, además de generar respuesta inmune, liberación de feromonas, termorregulación y ser fuente de factores de crecimiento. Es túbulo-acinar y presenta un conducto secretor que se abre en el canto posterior de la membrana nictitante.⁷⁰ Esta glándula se ha valorado mediante ecografía y en el caso del conejo su localización es medial al globo ocular y ventral al espacio retrobulbar. En el caso del guinea pig su localización es posterior y ligeramente ventral al globo ocular y en el caso de las chinchillas es también posterior pero más medial.⁷¹

2.3 Fase mucosa

La fase **mucosa o de mucina** es secretada por las células caliciformes conjuntivales que se localizan en mayor número en el fórnix conjuntival y en el epitelio corneal y conjuntival.⁷² En el ser humano se han localizado también en córnea, conjuntiva y glándula lacrimal.^{73,74}

Estas glándulas son apocrinas y su secreción mucosa, que es la capa más profunda de la película lacrimal, esta compuesta por mucina, inmunoglobulinas, urea, glicoproteínas, sales, glucosa, leucocitos, detritus celulares y enzimas.^{49,75}

El grosor de esta capa varia en función de si se encuentra cubriendo la córnea, siendo de 0,8 μm o de si es sobre la conjuntiva con 1,4 μm .³⁰ Su función es la de lubricar y proteger la córnea, anclar la fase acuosa al epitelio corneal, disminuir la tensión superficial para incrementar la estabilidad de la película lacrimal, prevenir la desecación y evitar la adherencia bacteriana.^{49,76}

La mucina esta compuesta por un grupo heterogéneo de oligosacáridos hidratados unidos a proteínas, las cuales se sintetizan en el retículo endoplasmático de la células caliciformes y se unen a los glúcidos en el aparato de Golgi. Estas glicoproteínas se almacenan en gránulos/vesículas en la zona apical de las células caliciformes, las cuales al recibir un estímulo, fusionan las vesículas con la membrana limitante de las células y libera así el contenido sobre la superficie de la córnea. La mucina se puede clasificar en “unidas a membrana” o secretoras y ambas aparecen en la película lacrimal y epitelio de la córnea. Las primeras se concentran en el ápex de las microplicas (crestas en pliegues) de la superficie estratificada de las células epiteliales oculares y son MUC1, MUC4 y MUC16, mientras que las secretoras son solubles en la película lacrimal y se distribuyen sobre la superficie ocular durante el parpadeo formando un gel. Estas últimas son MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC7, siendo MUC5AC la que forma la columna vertebral de la fase mucosa.^{37,77,78}

Estudios recientes sobre MUC1 y MUC16 localizadas en el epitelio corneal y conjuntival han demostrado que dichas mucinas interactúan con la proteína galactina-3 confiriendo una mayor estabilidad de la barrera mucosa.⁷⁹

Esta mucina esta compuesta de 4 D dominios, ricos en cisteína, que flanquean una secuencia repetida en tándem y cuyo aminoácido se encuentra O-glicosilado y unido a una cadena lateral de carbohidrato (Fig.4).⁷³ Su estructura ha sido estudiada y comparada en el ser humano, conejo y perros⁸⁰ y se han observado diferencias como que en el ser humano la mucina ocular esta cargada negativamente y termina en ácido siálico, mientras que en el perro y conejo son neutrales y terminan en alfa 1-2 fucose y/o alfa 1-3 N-acetilgalactosamina. Enfermedades de la superficie ocular como la QCS genera alteraciones en la O-glicosilación comprometiendo la estabilidad de las mucinas.^{79,81,49}

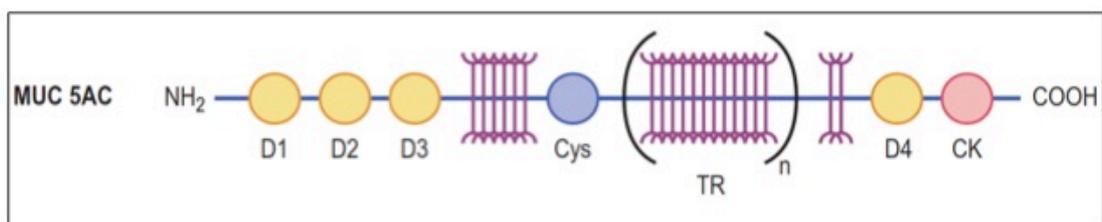


Figura 4: Diseño estructural de la mucina formadora de gel. Modificado de Gipson et al, 2003.⁷³

2.4 Glicocalix

El **glicocalix** es una red de polisacáridos que se proyectan desde la superficie ocular y se encargan de cubrir el epitelio corneal y conjuntival. La mucina es su componente esencial y como se ha comentado antes es un núcleo de proteínas de aminoácidos unidos a una cadena lateral de carbohidratos por O-glicosilación y aquellas que componen el glicocalix son MUC1, MUC4 y MUC16 (“unidas a membrana”). Son producidas por las células escamosas estratificadas de las células epiteliales de la córnea y conjuntiva. Se localiza en la porción apical de las microvellosidades del epitelio corneal y conjuntival y mediante su cadena de carbohidrato se unen a la fase mucosa de la película lacrimal, extendiéndose 300 nm desde las microvillosidades y microplicatas. Su función es la de hidratar la superficie ocular y generar una barrera frente a patógenos, además de permitir a la fase mucosa desplazarse por la superficie ocular.^{37,73,82}

3. FISIOLÓGÍA DE LA PELÍCULA LACRIMAL

3.1 Fase mucosa: Regulación de la producción de mucina, secreción de electrolitos y agua

La inervación es el primer regulador de la secreción de las células caliciformes de la conjuntiva, presentando una vía aferente y una eferente simpática y parasimpática. La estimulación de los nervios sensoriales en la córnea induce la secreción por medio los nervios eferentes.³⁷ Los neurotransmisores liberados por los nervios parasimpáticos son la acetilcolina (ACh) y péptido intestinal vasoactivo (VIP), mientras que la norepinefrina y neuropéptido Y (NPY) son liberados por los nervios simpáticos. Actualmente la ACh y VIP son el estímulo primario sobre las células caliciformes para su secreción, mientras que la función de los nervios simpáticos aún se desconoce.^{83,84}

La vía de actuación de la acetilcolina para la secreción de las células caliciformes actúa sobre los receptores M₃AChR y M₂AChR de estas células.⁸⁵ Más específicamente sobre la subunidad de la proteína G, G_{αq/11}, que activa la fosfolipasa C y así dar lugar al inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG).

IP₃ libera el calcio intracelular uniéndose a sus receptores en el retículo endoplasmático, y este incremento de la concentración de calcio intracelular estimula la secreción de mucina.^{86,87} DAG por su parte activa la proteína quinasa C (PKC), la cual presenta isoformas que al activarse estimulan la secreción de las glándulas caliciformes.⁸⁶

Otra vía de secreción mediada por los agonistas colinérgicos es la del factor de crecimiento epidermal (EGF), en donde el receptor EGF es fosforilado por la tirosina quinasa Pyk2 y p60Src, lo que atrae a las proteínas Shc y Grb2 activando el factor SOS que incrementa la actividad de proteínas Ras.⁸⁵ Estas activan la quinasa MAPK (Ras) que fosforila la quinasa MAPK (MEK) y esta última fosforila ERK1/2 que estimula la secreción.^{88,89}

A parte de la regulación neural, la secreción de mucina puede ser modulada por la proliferación de las células caliciformes.⁹⁰ Estudios realizados en ratas y en humanos ha demostrado que la activación de las isoformas de PKC, mediado por EGF, estimula la proliferación de las células caliciformes conjuntivales.⁹¹

La composición de electrolitos y de agua en el medio externo tiene un efecto importante sobre la liberación de mucinas por parte de los gránulos secretores.

Las células de la conjuntiva presentan un lado basolateral (torrente sanguíneo) y otro apical (lágrima) y las proteínas transportadores de iones se encuentran distribuidas por toda la conjuntiva realizando funciones tanto de absorción como secreción (Fig.5).^{92,93}

En el lado basolateral se localiza Na⁺, K⁺ ATPasa que se encarga de expulsar 3Na⁺ de la célula para permitir la entrada de 2K⁺ y así generar un voltaje intracelular negativo. También se localizan el co-transporte Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC1) y el intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻ que se encargan de introducir Cl⁻ en la célula para luego ser secretado por el lado apical a través de los canales de Cl⁻. El K⁺ absorbido es también secretado por la zona apical junto con el Na⁺ que se mueve a través de la vía paracelular y así generar una secreción isotónica de estos electrolitos en la lágrima.^{37,94} En el lado apical se localiza el co-transporte de Na⁺ dependiente de glucosa, permitiendo la entrada de Na⁺ que posteriormente llegará hasta la zona basolateral para ser expulsado por ATPasa y así generar el voltaje negativo.

Asimismo la entrada de Na^+ puede ser usada para el transporte de aminoácidos (AA) en la célula.⁹⁵

La estimulación de la secreción de fluidos por la conjuntiva se ve influenciada por el incremento de la concentración de Ca^{+2} intracelular o el nivel celular de AMPc. Cuando hay un incremento de AMPc celular se activa la proteína quinasa A (PKA) que estimula a nivel basolateral la secreción de Cl^- y la absorción de Na^+ a través de los canales de K^+ y así tiene lugar la hiperpolarización celular; y a nivel apical estimula los canales de Cl^- . Esta hiperpolarización hace que el Na^+ sea absorbido hacia la célula y que el Cl^- sea secretado hacia la lágrima a través de la membrana apical.

Todo esto conlleva a que haya una mayor secreción de Cl^- en comparación con la absorción de Na^+ , lo que promueve que el agua fluya de dirección basolateral hacia apical en el interior celular. El agua además posee unos canales propios llamados acuaporinas (AQP), donde AQP 5 se expresa en la membrana apical y 3 en la lateral.^{96,97}

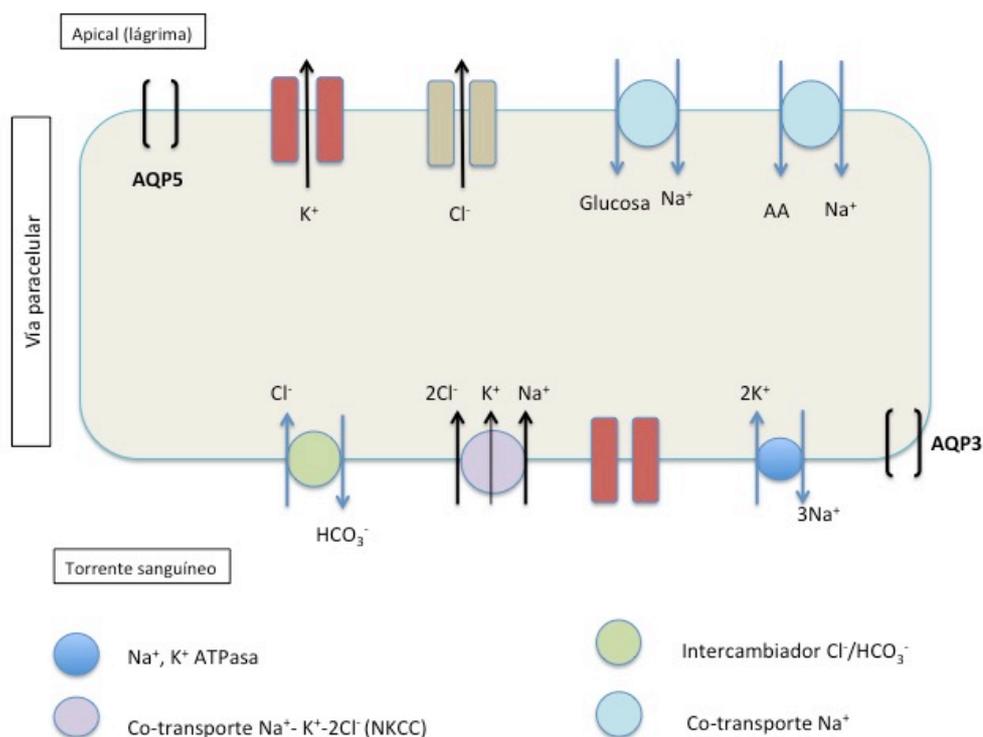


Figura 5: Esquema de la secreción de electrolitos y agua. Modificado de Dartt DA,2002.⁹³

3.2 Fase acuosa: regulación de la secreción proteica, electrolitos y agua junto con la actividad neural

La secreción proteica en la glándula lacrimal orbital es llevada a cabo por exocitosis. Las proteínas secretadas son almacenadas en gránulos, que tras recibir un estímulo adecuado, hacen que las membranas de estos gránulos se fusionen con las membranas apicales plasmáticas de las células para liberar el contenido merocrino en el lumen. A parte de los neurotransmisores que influyen en esta secreción, también se hayan factores tales como SNAREs y Rabs, que se encargan de atraer a los gránulos y a las membranas apicales, favorecer su fusión y la maduración de las vesículas.⁹⁸

Los principales neurotransmisores que modulan la secreción proteica son Ach, VIP y los agonistas adrenérgicos (Fig.6).^{37,99,100,101}

La **Ach** se une al receptor M₃AchR de las células acinares de la glándula lacrimal. Así se estimula proteína G (G_{αq/11}), que activa la fosfolipasa Cβ y da lugar a IP₃ y DAG. IP₃ se une al retículo endoplasmático liberando calcio, para así aumentar la concentración de Ca²⁺ intracelular. El consumo de este Ca²⁺ es lo que causa el flujo de entrada de este ión a través de la membrana plasmática, activando las proteínas diana que se ven envueltas en el proceso de exocitosis. Por otro lado, DAG activa PKC, cuyas isoformas (α, δ, ε) se ven envueltas en la secreción proteica.⁹⁹ También los agonistas colinérgicos inhiben la señal de secreción mediante la activación de Pyk2 y p60Src, para dar el producto final de ERK1/2, que bloquea la vía de liberación proteica.

VIP se une a los receptores VPAC 1 y 2 para activar la proteína G (G_{αs}), que estimula la adenil ciclasa para producir AMPc, el cual activa PKA que fosforila proteínas diana que intervienen en el mecanismo de la exocitosis y así producir la secreción de proteínas. También favorece la entrada de calcio intracelular que junto con AMPc aumenta la secreción proteica.¹⁰⁰ Otra de las funciones de VIP es inhibir ERK1/2 por lo que interfiere con la vía colinérgica y α₁-adrenérgica. Al encontrarse ERK1/2 bloqueados no se puede inhibir la secreción y por lo tanto esta se incrementa.¹⁰²

Los **agonistas α₁-adrenérgicos** se unen a los receptores α_{1D}-AR de las células acinares, activando así la óxido nítrico sintasa que se localiza en las

membranas basolaterales de estas células. El mecanismo de activación se desconoce, pero hace que se produzca óxido nítrico que activa la guanilciclasa (GC). GC produce GMPC que fosforila las proteínas diana en el proceso de exocitosis.¹⁰³ Agonistas α_1 -adrenergicos también activan las isoformas PKC, siendo PKC ϵ la que estimula la secreción proteica y PKC α , δ las que la inhiben.^{101,104} La vía de inhibición, al igual que los agonistas colinérgicos es a través de la activación de ERK1/2, aunque la vía es diferente, ya que los agonistas α_1 -adrenergicos activan la cascada de la matriz metaloproteinasa ADAM17 para ello.¹⁰⁵

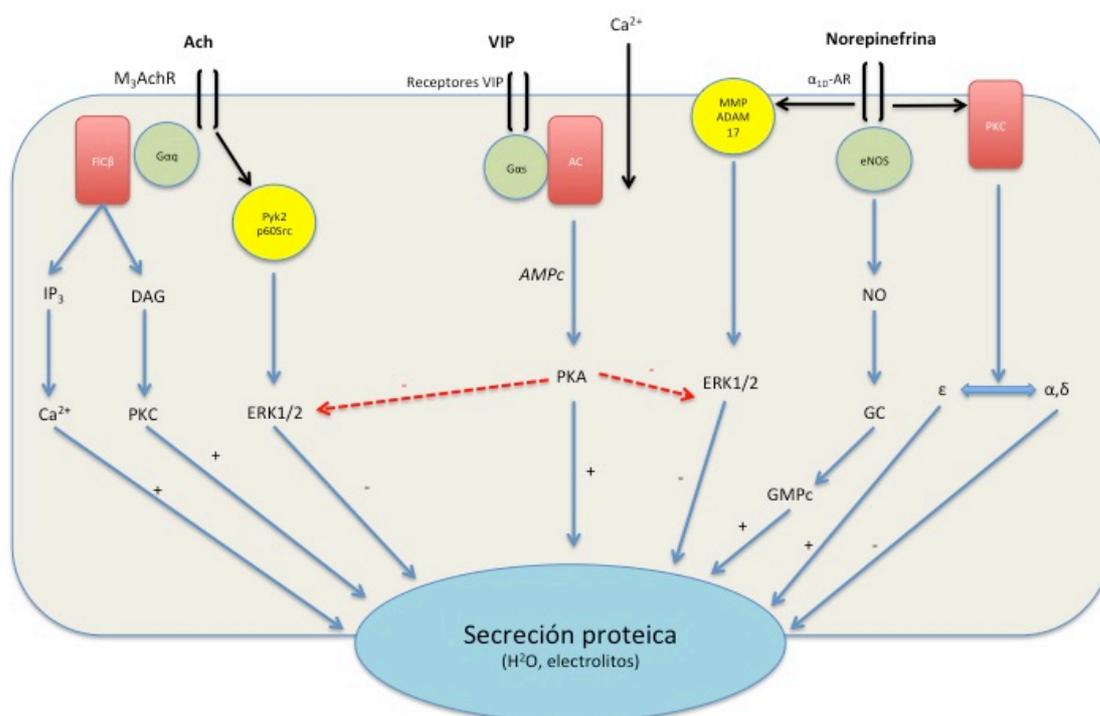


Figura 6: Mecanismo de acción de los neurotransmisores en la regulación proteica. Modificado de Dartt DA. 2011.^{37,99,100,101}

Secreción de electrolitos y agua por las células acinares y ductulos

El flujo de agua por el epitelio acinar es debido al cambio de gradiente osmótico por el transporte activo de los diversos electrolitos. Las Na⁺, K⁺, ATPasas se localizan tanto en el lado basolateral como apical, produciendo energía al salir el Na⁺ y entrar K⁺ a través de la membrana celular. En la membrana basolateral también se localizan los intercambiadores de Na⁺/H⁺ y Cl⁻/HCO₃⁻ que junto con el co-transporte Na⁺-K⁺-2Cl⁻ usan la energía obtenida del gradiente positivo de entrada del

Na^+ a la célula para permitir la entrada de Cl^- . Este flujo de Cl^- establece un gradiente de salida de dicho ión por la membrana apical hacia el lumen mediante canales selectivos, generando así un potencial diferencial negativo que favorece que el Na^+ fluya a través de la vía paracelular. El K^+ se recicla por canales selectivos de dicho ión que se localizan a nivel de la membrana basolateral y así los acinis producen un fluido rico en $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$.^{37,106}

En los ductulos el mecanismo es similar al de los acini y su principal diferencia es que los canales de K^+ se localizan en la membrana apical junto con los de Cl^- , lo que produce que el fluido sea rico en $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$.³⁷

Activación neural de la secreción de electrolitos y agua

Los agonistas parasimpáticos estimulan la secreción acinar de electrolitos y de agua mediante la activación de los canales de Cl^- y K^+ a nivel apical y del intercambiador Na^+/H^+ en la membrana basolateral. También generan un aumento en la translocación o movimiento de Na^+ , K^+ , ATPasas desde vesículas del citoplasma a la membrana basolateral.¹⁰⁷

A nivel de las células de los ductulos la estimulación incrementa la concentración de calcio intracelular, lo que genera la activación de los intercambiadores Na^+/H^+ seguidos de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ situados en la membrana basolateral. Se produce un incremento de Cl^- en la célula que hace que aumente su flujo de salida a nivel apical. El aumento de calcio también activa $\text{IK}_{\text{Ca}1}$ a nivel apical, generando un flujo de salida de K^+ y así se obtiene un fluido rico en $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ que se mezcla con el de las células acinares, llegando así a la superficie ocular un fluido lacrimal rico en Na^+ , K^+ y Cl^- .¹⁰⁸

3.3 Fase lipídica: regulación neural y hormonal

La regulación *neural* es llevada a cabo por la inervación sensorial, simpática y parasimpática, aunque actualmente su rol en la función sobre las glándulas de meibomio no está descrito. Los neurotransmisores liberados por la inervación simpática son las catecolaminas y neuropéptido Y y en la parasimpática los agonistas colinérgicos, VIP y óxido nítrico.¹⁰⁹

La regulación *hormonal* sobre las glándulas de meibomio se basa en que presentan receptores tanto para andrógenos como estrógenos. Cuando se estimulan los receptores de andrógenos aumenta la secreción lipídica, ya que se incrementa la transcripción genética para las enzimas asociadas con la síntesis de ácidos grasos y colesterol.¹¹⁰

4 QUERATOCONJUNTIVITIS SECA EN LA ESPECIE CANINA

La definición de QCS ha ido variando a lo largo del tiempo. En 1995 se consideraba un desorden de la película lacrimal debido a una deficiencia o excesiva evaporación, lo que causaba un daño en la superficie ocular y estaba asociado a signos de malestar ocular. En 2007 la Sociedad de la Película Lacrimal y Superficie Ocular describió ojo seco como una enfermedad multifactorial de la lágrima y superficie ocular, que da lugar a síntomas de incomodidad, problemas visuales e inestabilidad en la película lacrimal, con un potencial daño sobre la superficie ocular. Además, esta acompañado de un incremento en la osmolaridad de la película lacrimal. Diez años más tarde, esta misma sociedad ha modificado la definición considerándola una enfermedad multifactorial de la superficie ocular que se caracteriza por la pérdida de homeostasis en la película lacrimal y que se acompaña de signos oculares, en donde la inestabilidad e hiperosmolaridad de la lágrima, inflamación y daño de la superficie ocular y anormalidades neurosensoriales juegan un papel etiológico.^{7,8}

En la población humana a nivel mundial, esta enfermedad es padecida por un 5 a 37%, incrementándose con la edad de las personas. En Estados Unidos supone un coste anual de 3.84 millones de dólares.^{3,8}

En medicina veterinaria el primero en publicar sobre la prevalencia en la especie canina fue el profesor Lloyd Helper en 1976 con un 0,4% de la población en América del Norte, para luego incrementar ese porcentaje hasta el 1% en 1996.^{111,112} En 1998 el doctor Renee Kaswan publicó una prevalencia del 35% en una población canina de 460 perros¹¹³ y Peirce y colaboradores¹¹⁴ seleccionaron de forma aleatoria una población de mil perros, concluyendo que el 4% presentaba valores de Test de Schirmer menores de 10 mm/min.

Con la modificación de la hipótesis a lo largo de los años, la etiología de esta enfermedad no se basa exclusivamente en la calidad y cantidad de la lágrima, sino que se puede centrar en los diferentes componentes de toda la unidad funcional lacrimal:⁷

- Inervación corneal (par craneal V) que genera sensación de sequedad
- Inervación autónoma simpática y parasimpática
- Glándula lacrimal principal, de Meibomio y las células caliciformes que afectan a la producción de los componentes de la película lacrimal.
- Dúctulos de las glándulas y orificios de Meibomio en la liberación de la lágrima.
- La capa lipídica, acuosa y de mucina en la calidad de la lágrima.
- La anatomía y funcionalidad de los párpados para la distribución, retención, drenaje y evaporación de la lágrima.
- Topografía corneal en la retención y evaporación de la lágrima.
- Aparato nasolacrimal en el drenaje de la lágrima.

4.1 Etiopatogenia

Las causas de la deficiencia en los componentes de la película lacrimal, en este caso de la fase acuosa, puede ser el resultado de un solo proceso o de una combinación de varios que afectan a la glándula orbital y de la membrana nictitante. Entre las causas destaca en un alto porcentaje la inmunomediada/inflamatoria, concretamente sobre el tejido específico de la glándula, de la cual hablaremos a continuación.¹¹⁵ Otras causas de QCS son las blefaritis crónicas¹¹², hipoplasia/aplasia acinar¹¹⁶, inducida por drogas (atropina, sulfonamidas, etodolaco...) ^{117,118,119}, neurogénica¹²⁰, enfermedades sistémicas (infecciosa o metabólica)^{121,122,123}, irradiación, escisión quirúrgica, traumatismos y predisposición racial.^{12,112}

En la QCS inmunomediada no está del todo establecido su mecanismo de acción, pero se asemeja al síndrome de Sjögren (SS), el cual afecta a más de un millón de personas en Norte América, y preferiblemente mujeres.¹²⁴ En esta enfermedad inmunomediada se produce una infiltración en las glándulas exocrinas de células T CD4+ y B, que generan una respuesta inflamatoria debido a la síntesis y secreción de citoquinas proinflamatorias.^{125,126} En el estudio de Stern y colaboradores se tomaron biopsias de conjuntivas de pacientes con ojo seco por SS y

otros que no padecían dicha enfermedad, y se observó que ambos grupos presentaban infiltración de linfocitos, siendo los predominantes CD3, CD4+ además del complejo de histocompatibilidad de clase II (MHC-II).¹²⁷ Otra teoría es la producción de autoanticuerpos, como aquellos frente al receptor muscarínico M₃ de los acini, que están envueltos en la disfunción de la producción de lágrima y saliva, aunque su rol es muy controvertido según ciertos autores.¹²⁸

En el caso de medicina veterinaria, se han realizado estudios histopatológicos de dichas glándulas en animales con QCS¹²⁹ y análisis de los linfocitos mediante inmunohistoquímica en la glándula de la membrana nictitante de perros sanos, con QCS idiopática y neurogénica.^{9,17}

Los hallazgos en el estudio de Kaswan y colaboradores se correspondieron con diferentes grados de adenitis multifocal crónica, que se caracterizaban por la presencia de atrofia acinar y un aumento de células plasmáticas y linfocitos (CD4+), junto con un aumento del tejido conectivo fibroso en el estroma. Las estructuras tubulares se encontraban dilatadas con la presencia de neutrófilos y detritus celulares.¹²⁹

En el caso de la inmunohistoquímica no se pudo valorar la presencia de población CD 4+ y 8+ ya que no se tenía acceso a los anticuerpos frente a ellos, pero sí CD3+ T y CD79a B. Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo tanto de las células T y B en los animales con QCS idiopática, observándose una infiltración periacinar. Este infiltrado no es el único mecanismo en la compleja enfermedad de QCS, ya que influyen otros factores como la apoptosis de las células epiteliales glandulares, la liberación de citoquinas proinflamatorias y la inhibición del estímulo neurológico afectando a la liberación de neurotransmisores.^{9,17}

La *apoptosis* se encuentra aumentada en las células epiteliales conjuntivales y la de los acini de la glándula lacrimal de aquellos perros que presentan QCS idiopática. Al contrario ocurre con los linfocitos, cuya apoptosis está disminuida.¹³⁰ En este estudio también se puso de manifiesto que el uso de ciclosporina A a una concentración de 0,2% revertía esta situación, induciendo una mayor apoptosis en los linfocitos y suprimiendo el de las células acinares y conjuntivales.

La liberación de *citoquinas proinflamatorias* promueven la inflamación, generando un estado crónico que promueve un mayor daño sobre el tejido glandular ,

y al mismo tiempo interfieren en el normal funcionamiento de la glándula.^{18,131} En el caso del SS en humana, las primeras citoquinas aisladas en glándulas salivares fueron IL-2, IL-6, IL-10 y TGF- α ¹³², aunque a lo largo de estos años se han detectado otras como IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-5, Y- IFN e IL-17 en la glándula lacrimal y película lacrimal de pacientes con dicha enfermedad.^{18,133,134} Previó a estas conclusiones se han realizado estudios en biomodelos de animales como en el caso del ratón¹³⁵, teniendo MRL/+ y MRL/lpr como modelo reconocido para SS y los NOD (no obesos diabéticos). Estos primeros al igual que en humana, las hembras presentan una mayor susceptibilidad de infiltración de linfocitos T en las glándulas y aquellos que presentaban el gen *lpr* sufrían una inflamación más agresiva ya que este codifica la apoptosis de las células epiteliales de la glándula lacrimal.^{136,137} En el caso de los ratones NOD la inflamación de la glándula lacrimal, además de en otros órganos como el páncreas y la tiroides, está mediada por los linfocitos Th1 CD4, los cuales producen citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-10, Y- IFN y TNF α . En estos animales también se han hallado autoanticuerpos para el receptor M₃, y se sugiere que la hiposecreción es debida a que estos receptores son necesarios para la translocación de las proteínas de AQP.^{138,139} La *inhibición del estímulo nervioso* ha sido estudiada en los ratones NOD, donde se ha observado una disminución de la actividad de oxido nítrico sintasa que conlleva a una reducción de la actividad parasimpática, y de VIP que actúa en las diversas señales de cascada.¹⁴⁰ En este estudio también se llegó a la conclusión de que las alteraciones funcionales en las vías preceden a la respuesta inmune sobre estas glándulas exocrinas.

4.2 Signos clínicos

Los signos clínicos varían dependiendo de la cronicidad de la enfermedad, observándose descarga ocular e hiperemia conjuntival en los estadios tempranos, progresando la queratitis hasta visualizarse vascularización, edema y pigmento sobre la superficie corneal, llegando incluso hasta la ulceración.¹² Existen diferentes patrones para esta enfermedad, el A, donde los signos son más agudos con un alto porcentaje de queratitis ulcerativa y una menor producción de descarga ocular y conjuntivitis. Y el B con mayor descarga ocular y conjuntivitis, pero menos presencia de queratitis ulcerativa.¹⁴¹ En el patrón A las razas más afectadas fueron Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) y los Shih Tzu, con una distribución de edad

menores de 2 años o mayores de 6 años y una mayor representación de machos no castrados. El patrón B se observó que English Cocker Spaniel y West Highland White Terrier (WHWT) estaban más representados, con una media de edad de 5 años y una mayor representación de hembras.

4.3 Técnicas diagnósticas

Para el diagnóstico de QCS existen diversos tests y tinciones, siendo el Test de Schirmer el estándar para evaluar la producción de lágrima. Existen dos tipos, el I que mide la producción de lágrima tanto refleja y basal y el II, que mide la secreción basal tras aplicar un gota de anestésico tópico.¹² Los valores varían según los estudios publicados, siendo 18,8 +/- 2,62 mm/60 s en el tipo I y de 9,52 +/- 4,55 mm/60 s en el II¹⁴², o incluso entre las diferentes razas de perros.¹⁴³ Respecto a las razas predispuestas a padecer QCS, como Cavalier King Charles Spaniel, Bulldog Inglés, Shih Tzu, Pug, WHWT entre otras; el estudio de Peirce observó que la producción de lágrima era menor en ellos, aún estando sanos en comparación con otras razas no predispuestas.¹¹⁴

Las tinciones como el rosa bengala y verde lisamina se usan para evaluar defectos sutiles epiteliales de la conjuntiva y de la superficie de la córnea, así como la fluoresceína para evaluar el tiempo de ruptura de la lágrima, su estabilidad y la presencia de una lesión a nivel corneal.^{142,144} Para ello, en la especie canina se instila una gota de fluoresceína en la zona superior y mediante la luz azul cobalto se debe de observar el tiempo de ruptura en el cuadrante supero-temporal, siendo el valor en perros sanos de 22 +/- 7 segundos.^{142,145}

Otros, como el rojo fenol, se ha usado más comúnmente en pequeños mamíferos, pero cuya aplicación ya se esta usando en la especie canina con valores en perros sanos de 29,3 +/- 3,45 mm en 15 segundos según últimos estudios.¹⁴²

Estudios recientes han valorado la osmolaridad, tanto en animales sanos y con QCS, la meibometria y el test lagrimal de Ferning, favoreciendo así el diagnóstico de patologías que afectan a la superficie ocular.^{146,147,148}

4.4 Tratamiento

Para el tratamiento se disponen de lacrimoestimulantes y lacrimomiméticos. En el primer grupo se encuentran los agonistas colinérgicos como la pilocarpina y los agentes inmunosupresores, tales como la ciclosporina y tacrolimus.³⁰ La pilocarpina aporta estimulación parasimpática a la glándula, y se aplica vía oral. El uso de agentes simpaticomiméticos como la fenilefrina, tras la instauración de la dosis adecuada de pilocarpina, ayuda a la musculatura lisa que rodea a los ductos en la liberación de la lágrima.^{30,149,150} La ciclosporina tópica se encuentra en diferentes concentraciones, como 0,2%, 1% y 2% y su mecanismo de acción es mediante la unión a la inmunofilina llamada ciclofilina (CpN), que impide la acción de la calcineurina y de esta forma disminuye la producción de IL-2. Al bloquearse la expresión de IL-2 se bloquea la proliferación y activación de las células T.¹⁵¹ El tacrolimus también inhibe la calcineurina, pero para ello se une a la inmunofilina llamada proteínas de unión FK506. Se encuentra a una concentración de 0,02% o 0,03% y según la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) se recomienda su uso en caso de que otros medicamentos no sean efectivos.¹⁴⁹ En el estudio de Hendrix y colaboradores se comparó el efecto de ciclosporina y tacrolimus en pacientes con QCS y se observó que en ciertos pacientes sin respuesta a la ciclosporina, sí que aumentaba STT tras el uso de tacrolimus.¹⁵²

Otros productos como el pimecrolimus 1% ha demostrado tener un mayor efecto que la ciclosporina, sobre todo a nivel inflamatorio de la superficie ocular.¹⁵³ Lo contrario sucede con otros más recientes como ocacitinib 0.1% , él cual se ha demostrado tener una menor eficacia que tacrolimus 0.01%.¹⁵⁴

El uso crónico de estos medicamentos tópicos se ha visto relacionado con la aparición de carcinoma de células escamosas primario sobre la superficie de la córnea.¹⁵⁵

Los lacrimomiméticos o sustitutos de la película lacrimal contienen uno o varios ingredientes que permiten reemplazar uno o varios componentes de la película lacrimal tal como la fase acuosa, mucina o lípidos y se aplican de 4 a 6 veces al día.¹²

Otros productos como antibióticos de amplio espectro y agentes anticolegenasa son útiles en el caso de tener úlceras corneales o tener abundante

descarga ocular; y el uso de antiinflamatorios tópicos como corticoides para minimizar la conjuntivitis, aliviar malestar o reducir opacidades corneales.¹²

5 TERAPIA CON CÉLULAS MADRE

5.1 Conceptos y generalidades

Las células madre (CM) son definidas como células indiferenciadas, que frente a ciertos estímulos son capaces de dividirse de forma asimétrica y diferenciarse hacia células progenitoras o precursoras (ectodermo, mesodermo y endodermo), manteniendo una alta capacidad de autorenovación.^{156,157} La primera vez que fueron nombradas en la literatura fue en 1968¹⁵⁸ y actualmente en España se considera un medicamento, por lo que para su uso médico se requiere de una autorización supervisadas por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).²²

Se distinguen tres tipos de CM, las *embrionarias* obtenidas del embrión antes de su implantación en el útero, las *adultas* que pueden ser inmaduras cuando se obtienen de los tejidos fetales antes del nacimiento o maduras cuando se obtienen tras el nacimiento. Y las *pluripotentes inducidas*, que son células adultas diferenciadas a las que se le induce de nuevo su pluripotencialidad mediante técnicas de reprogramación celular.^{156,159}

Las fuentes de obtención de estas CM son la médula ósea, tejido adiposo, membrana amniótica y cordón umbilical.¹⁵⁶

Las propiedades de las CM es de una gran capacidad inmunomoduladora, inmunosupresiva y antiinflamatoria y para ello se han realizado estudios en las diferentes especies con células obtenidas de diversas fuentes, en los cuales se ha valorado la expresión de las proteínas de su superficie mediante citometría de flujo o inmunofenotipado. En el caso de la especie canina, las células obtenidas de tejido adiposo mostraron ser positivas a los marcadores de superficie MHC I, CD44 Y CD90 y a los mediadores pro-inflamatorios como TGF β , HGF, PGE₂, IDO, IL-6, IL-8, VEGF y COX2. La importancia de no presentar sobre su superficie el MHC II, es que estas células no sirven como presentadoras de antígenos, por lo que no desarrollan la respuesta inmune.¹⁶⁰

La capacidad de estas células en intervenir en la **proliferación** de linfocitos se ha estudiado *in vitro* en diversas especies como en la canina¹⁵⁴, primates¹⁶¹, pollos¹⁶², conejos¹⁶³ y caballos¹⁶⁴ entre otras. Una de las hipótesis para la inhibición es que las CM inducen el arresto/bloqueo en la fase G₀, que se corresponde con linfocitos inmaduros que se encuentran en reposo y así evitar su activación y progresión en el ciclo celular.¹⁶⁵ También disminuyen la expresión de marcadores de activación de estas células T (CD25, CD38, CD69) evitando su activación y proliferación, ya que CD25 es un receptor IL-2 que al activarse saca a las células de su estadio G₀.¹⁶⁶

Las CM **interaccionan** con otras células inmunes como las células dendríticas (CD) y *natural killer*, presentando estas primeras una elevada expresión de antígenos MHC tipo II, el cual al formar el complejo MHC II-péptido se expresa sobre la superficie de la CD y se presenta a los linfocitos T CD4+. Para sufrir este proceso de maduración y llegar a los órganos linfoides con linfocitos en reposo necesitan sufrir una estimulación bien por patógenos, inflamatoria o daño tisular.¹⁶⁷

Otras de las características de las CM es la **producción** de mediadores pro-inflamatorios que regulan la inflamación y estimulan la angiogénesis. Estos mediadores varían dependiendo la especie y el tejido de origen, pero en el caso de CM de perro de origen tejido adiposo se ha visto un incremento significativo de TGF β1 frente a linfocitos en cultivos *in vitro*¹⁵⁶, aunque no hay estudios que confirmen que este mediador altere el fenotipo regulador de los linfocitos T.¹⁶⁸ Otros estudios demuestran que el bloqueo de los mediadores PGE₂ e IDO que son producidos por las CM de origen adiposo restauran la proliferación de linfocitos, observando que ambos mediadores intervienen en la modulación de las CM con ellos (Fig.7).^{156,169,170}

Aunque muchos de los estudios con CM se han realizado *in vitro* con resultados efectivos frente a procesos inflamatorios, si que se ha observado un efecto más variable *in vivo*. Factores que contribuyen a esto son las variaciones naturales de cada patología y la ausencia de una dosis estándar de CM, además de la ruta de infusión y fuente de origen de las células. Esto también es debido a que la mayoría de las publicaciones *in vivo* se corresponden con casos aislados, serie de casos o estudios no controlados.¹⁷¹

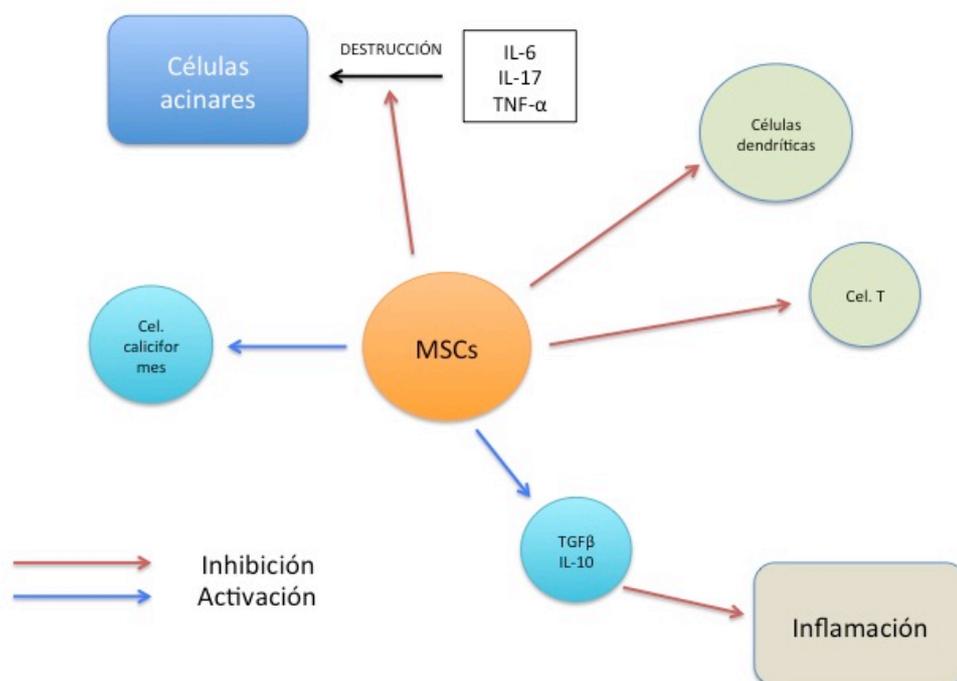


Figura 7: Mecanismo de las células madre mesenquimales (CMM). Modificado de Lu et al. 2017.¹⁷⁰

5.2 Terapia en medicina veterinaria

En medicina veterinaria los estudios se han centrada en lesiones tendinosas en los caballos¹⁷², además de queratitis inmunomediada.¹⁷³ En el caso de la especie canina se han realizado estudios en rotura del ligamento cruzado¹⁷⁴, osteoartritis¹⁷⁵, enfermedad discal crónica¹⁷⁶, meningoencefalitis¹⁷⁷, cardiomiopatía dilatada¹⁷⁸, dermatitis¹⁷⁹, enfermedad inflamatoria intestinal¹⁸⁰ y QCS.^{20,21} Y en la especie felina la enfermedad renal crónica¹⁸¹, gingivoestomatitis¹⁸², inflamación intestinal¹⁸³ y queratitis eosinofílica.¹⁸⁴

En ambos estudios para QCS se usaron CM obtenidas de tejido adiposo de un donante y se infiltraron de forma local. Se observó que era un proceso seguro y que los signos clínicos mejoraban a lo largo de los meses, pero no hubo una población control con tratamiento médico para comparar ambas terapias.^{20,21}

El uso de la terapia celular entraña ciertos riesgos que pueden incluir la formación de tumores, respuestas inmunes no deseadas y la transmisión de agentes no deseados. Esto puede depender del tipo de CM usada, el estado diferenciado en el que se encuentra y su capacidad proliferativa, la ruta de administración y su

localización y la manipulación durante su cultivo.¹⁸⁵ La seguridad ha sido evaluada en perros sanos con la aplicación local repetida en la glándula de la membrana nictitante y en la principal con CM obtenidas de tejido adiposo con resultados satisfactorios, observándose únicamente una leve quemosis y congestión ocular en la zona de inoculación.¹⁸⁶

6 SISTEMAS DE ESTADIFICACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA VETERINARIA

El uso de escalas clínicas es impulsado para la ayuda al diagnóstico, decisiones en el tratamiento y comunicación con otros profesionales.¹⁸⁷ Desafortunadamente la creación de una escala es un proceso complejo, ya que la forma de medir muchas variables depende de sus definiciones, que van variando de persona a persona, además de la relación entre la observación y lo que esta refleja.¹⁸⁸

Durante el proceso de construcción de una escala es importante la fiabilidad y validez.

La *fiabilidad* es la propiedad que designa la constancia y la precisión de los resultados que obtiene un resultado al aplicarlo en distintas ocasiones. Se mide en grados y se expresa en forma de correlación que varía de 0 (ausencia de correlación) a 1 (correlación perfecta). La fiabilidad se puede estimar por varios medios; por un lado la consistencia interna que mide la homogeneidad de los enunciados de un instrumento indicando la relación entre ellos. Para su medición el más usado es el alfa de Cronbach, que se considera el más idóneo porque da un único valor de consistencia. También esta la estabilidad, equivalencia y la armonía entre observadores. La estabilidad mide la constancia de la respuesta obtenidas en repetidas ocasiones, en las mismas condiciones y por los mismos sujetos. Se usa la técnica test-retest y en el caso de ser variables cambiantes se determina en un intervalo de tiempo en el que se espera que no haya cambios. La equivalencia es otra forma de medir la fiabilidad cuando se dispone de dos o más versiones del mismo test. Y por último la armonía entre observadores que mide el grado de concordancia entre los resultados de dos o mas observadores al medir las mismas variables. Para ello se usa el coeficiente de correlación Kappa y la correlación intraclase.^{189,190}

La *validez* o exactitud es el grado de confianza que podemos tener de que la medición se corresponde a la realidad del fenómeno que se está midiendo.¹⁹¹

La validez de apariencia tiene como objetivo responder a la siguiente pregunta; ¿la escala parece medir lo que debe medir?, y por lo tanto no supone un concepto estadístico, sino de la decisión que conforma el grupo que va a crear la escala.¹⁹²

La validez del contenido evalúa de manera cualitativa si el cuestionario abarca todos los conceptos que se quieren medir, aunque en muchas ocasiones no hay un listado del contenido y por lo tanto hay que establecerlo, suponiendo un riesgo de que no se incluyan todos los conceptos. Los métodos usados pueden ser el de Delphi, Fehring y la metodología Q. En este caso es fundamental obtener una alta consistencia interna en la validez del contenido, ya que sino su no fiabilidad la haría poco útil en el ámbito clínico.¹⁹¹ La validez del criterio es el grado de correlación con un “gold standard” o test de referencia, que en el caso de no existir se debe de buscar otro instrumento que sirva de medida comparable.¹⁹⁰ Y por último existe la validez de constructo, utilizado en ciencias sociales, psicología y estudios de idiomas entre otras disciplinas. Aquí los conceptos son no observables directamente o hipotéticos, por lo que requieren de la validez de constructo para llegar a un acuerdo o consenso sobre su significado para otorgar el carácter de útiles y válidos desde un punto de vista científico.^{193,194}

En medicina veterinaria existen escalas para diversas enfermedades como en la enfermedad renal crónica¹⁹⁵, la Leishmaniasis canina^{196,197}, la enfermedad intestinal crónica canina¹⁹⁸ y enfermedad cardíaca degenerativa.¹⁹⁹ En todas ellas se ayuda al estadiaje de la enfermedad en función de la gravedad de los signos clínicos y así tomar decisiones terapéuticas. En el caso de la QCS no existe una escala tal y como en las enfermedades descritas anteriormente, pero si para diversos estudios concretos se crearon escalas para tener un seguimiento del tratamiento aplicado a lo largo de diferentes puntos de control.^{20,21,152}

Materiales y métodos

1. MATERIALES

1.1 Animales

Para la realización de este estudio se incluyeron 51 animales con QCS bilateral de origen inmunomediado y que no padecían ninguna otra patología sistémica procedentes del servicio de Oftalmología del Hospital Veterinario Universidad de Murcia (HCV). El diagnóstico de QCS se realizó en base a los signos clínicos descritos en la literatura¹², tales como Test de Schirmer inferior a 14 mm/min, descarga ocular, hiperemia conjuntival y pérdida de transparencia de la córnea. Para ello se sometió a todos los animales a un examen oftalmológico completo (neuro-oftalmología, Test de Schirmer I, estesiometría, tonometría, biomicroscopia, oftalmoscopia indirecta y tinciones específicas), junto con una analítica completa de sangre y serología de *Leishmania* para descartar otras causas de QCS, que no fuese compatible con origen inmunomediado. Para ser incluidos en el estudio se consideró además que se tratase de pacientes en un estado crónico de la enfermedad sin mejoría consistente con el tratamiento tópico convencional.

Todos los procedimientos incluidos en el presente estudio han obtenido las autorizaciones pertinentes reglamentarias del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia (Código autorización 210/2015) y la Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente (identificación nº A13160605) estando acorde con la Directiva Europea 2010/63/EU y el Real Decreto 53/2013 sobre experimentación con animales

1.2 Aparataje y material accesorio

- Foco de luz puntual Finoff (Heine®, Gilching, Alemania)
- Test Schirmer® (Eickemeyer®, Tuttlingen, Alemania)
- Tono-Pen XL (Mentor Ophthalmics®, USA)
- Lámpara de hendidura SL-7F (Topcon®, Tokyo, Japón)
- Oftalmoscopio indirecto con casco frontal Heine® Omega 500 (Heine®, Gilching, Alemania)
- Colircusí Anestésico doble® (Alcon Healthcare®, Barcelona, España)
- Colircusí Tropicamida® (Alcon Healthcare®, Barcelona, España)
- Fluoresceína sódica 20 mg/ml colirio solución® (Bausch Lomb®, Madrid, España)

- Dexdomitor® (Zoetis®, Madrid, España)
- Turbogesic® Vet (Pfizer®, Madrid, España)
- IsoFlo® (Esteve®, Barcelona, España)
- Desinпов iodine® Povidona Iodada 10% (Imark Hospital, Madrid, España)
- Solución Lactato de Ringer Hartmann Braun® (B.Braun Melsungen AG®, Melsungen, Alemania)
- Antisedan® (Zoetis®, Madrid España)
- Lipolac gel oftálmico® (Angelini®, Barcelona, España)
- Fórmula magistral de Ciclosporina 2% solución oleosa (Fórmula magistral, Farmacia Hospitalaria HCV, España)
- Condroitin sulfato 20% (Fórmula magistral, Farmacia Hospitalaria HCV, España)
- Hyaback lágrima artificial® (Thea®, Barcelona, España)
- Jeringuilla Insulina Omnifix® (B.Braun Melsungen AG®, Melsungen, Alemania)
- Aguja 23G Sterican Braun® (B.Braun Melsungen AG®, Melsungen, Alemania)

2 MÉTODOS

2.1 Elaboración del sistema de estadificación clínica

Para la creación de la escala se tomó en cuenta el panel de Delphi modificado² y los artículos de veterinaria en los que se usaron diferentes variables para valorar la alteración de la superficie ocular.^{20,152}

Para la recogida y una mejor interpretación visual de los datos se creó una hoja Word ilustrativa con las diferentes variables, lo que permitió dibujar las diferentes lesiones sobre la superficie de la córnea, además de asignarle un color específico a cada una de ellas (Fig.8 a y b).

Las variables que se tuvieron en cuenta y su graduación fueron:

1. Test de Schirmer:
 - 0: > 15 mm/min
 - 1: 14-10 mm/min
 - 2: 9-5 mm/min

- 3: < 5 mm/min
2. Descarga ocular (amarillo):
 - 0: ausente
 - 1: canto medial
 - 2: a lo largo de la fisura palpebral
 - 3: a lo largo de la fisura palpebral y que tras su retirada vuelve a aparecer en los siguientes parpadeos
 3. Hiperemia conjuntival:
 - 0: ausente
 - 1: conjuntiva bulbar
 - 2: conjuntiva bulbar y palpebral
 - 3: afección de todas las conjuntivas junto con inflamación
 4. Edema corneal (azul):
 - 0: ausente
 - 1: córnea central
 - 2: córnea central y medio-periférica
 - 3: córnea completa
 5. Pigmento corneal (negro):
 - 0: ausente
 - 1: uno o varios focos independientes en la córnea
 - 2: 2/3 de la córnea se encuentra cubierta o *spots*
 - 3: la superficie de la córnea se encuentra cubierta y no permite valorar cámara anterior
 6. Vascularización corneal (rojo):
 - 0: ausente
 - 1: varios vasos no arborizados que se originan en uno o varios cuadrantes
 - 2: vasos arborizados que se originan de todos los cuadrantes
 - 3: vascularización muy pronunciada con la presencia de tejido de granulación
 7. Test colorimétrico: fluoresceína (verde):
 - 0: ausente
 - 1: lesión superficial
 - 2: lesión estromal
 - 3: descemetocele
 8. Valoración de la cámara anterior

0: Pueden valorarse la estructuras intraoculares

1: No pueden valorarse las estructuras intraoculares

A cada paciente se le asignó un estadio en función de la suma de las diferentes variables, donde el leve (I) comprendía de 0 a 4, moderado (II) de 5 a 11, grave (III) de 12 a 18 y severo (IV) de 19 a 23 (Fig.9). Para la descripción de los diferentes parámetros que afectan a la córnea, tales como edema, pigmento y vascularización, se utilizó un esquema ilustrativo que divide primero a la córnea en superior, inferior, temporal y nasal, y luego en córnea periférica, medio-periférica y central.



Figura 9: Clasificación de los pacientes según las diferentes variables. **A=** estadio leve (I). **B=** estadio moderado (II). **C=** estadio grave (III). **D=** estadio severo (IV)

2.2 Diseño experimental

El estudio se compone de dos fases diferenciadas:

1. Estudio 1: elaboración del sistema de clasificación clínica: Contempló la elaboración del sistema de clasificación que luego se utilizó en las siguientes fases. Se usó una base de datos de 13 perros con QCS, que posteriormente no se incluyeron en el estudio para determinar la fiabilidad y concordancia de la escala a través de 3 observadores. Dos de ellos son diplomados por el Colegio Latinoamericano de Oftalmología Veterinaria (CLOVE) y el tercer observador es un veterinario interno del Servicio de Oftalmología con varios años de experiencia. Cada uno de ellos llevó a cabo de forma independiente y ciega respecto a la de los otros observadores la puntuación de cada variable y la asignación de un estadio clínico.
2. Estudio terapéutico
 - a. Fase inclusión: Contempló el periodo de inclusión de los 38 pacientes y la selección de aquellos que recibieron tratamiento con células madre. Este periodo comprendió en torno a un año y los propietarios fueron informados del proceso, recogándose un consentimiento informado específico.

El diseño experimental del estudio se basa en la selección de dos grupos:

- Grupo terapia médica (TM): Aquellos animales que padecían QCS bilateral y que se mantuvieron con tratamiento tópico (Ciclosporina 2% + lágrima artificial) sin la inoculación de terapia celular. La pauta de aplicación de la terapia fue de una gota cada 8 horas de ciclosporina y lágrima artificial *ad libitum* sin variaciones a lo largo del estudio terapéutico. Se les realizó controles en el mismo periodo y estuvo constituido por 28 individuos.
 - Grupo terapia celular (TC): Aquellos animales que padecían QCS bilateral y que recibieron el tratamiento mediante la administración de terapia celular sin la retirada total del tratamiento convencional; sino que se redujo a cada 12 horas, manteniéndose con dicha pauta durante todo el estudio terapéutico. Se les realizó controles a lo largo de un año y estaba constituido por 10 individuos.
- b. Fase de administración celular: Contempla el procedimiento de inoculación de las células madre bajo anestesia en la glándula orbital principal y de la membrana nictitante.

- c. Fase de seguimiento y obtención de datos: Comprende el seguimiento de los pacientes, tanto los del grupo terapia médica y celular, a los 45 días, 3, 6, 9 y 12 meses. En cada punto de control se realizó la gradación clínica para evaluar su evolución, comprendiendo este periodo en torno a dos años hasta obtener el último resultado.

2.3 Obtención y preparación de las dosis celulares

Se emplearon protocolos basados en la literatura^{200,201,202,203}, validados y adaptados por nuestro grupo de investigación. Se utilizaron células madre mesenquimales procedentes del tejido adiposo. Los lipoexplantes se obtuvieron de donantes sanos (ausencia de signos clínicos, al día en su programa de vacunación/desparasitación, y con serologías negativas para enfermedades infecciosas endémicas en su zona de residencia) que eran sometidos a cirugías electivas (castraciones, ovariectomías). Los lipoexplantes se obtenían de la grasa subcutánea, y/o intraabdominal. El explante era inmediatamente introducido en una solución de medio de cultivo y conducido en hielo para proseguir con la manipulación bajo campana de flujo laminar de bioseguridad y con material estéril. Tras lavado con PBS se procedía a la disgregación mecánica del explante mediante pinza y tijera, tras lo cual se sometían a digestión enzimática con colagenasa tipo I o A al 0,1% 60-90 minutos (en función de la disgregación del tejido) a 37°C. El producto era filtrado a través de un filtro de 100 micras y centrifugado a 486G durante 5 min a temperatura ambiente. Las células obtenidas se pasaban entonces en frascos de 25, 75 o 175 cm² (en función del recuento y viabilidad celular obtenido) con una densidad de 10.000 cls/cm². El medio de cultivo era DMEM suplementado con FBS, antibióticos, piruvato y L-glutamina y las condiciones de incubación fueron 37°C y 8,5% CO₂. Cuando se alcanzaba confluencia se realizaron los subcultivos subsecuentes hasta pase 2-3, utilizando una solución comercial Triple Express® (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Estados Unidos) para la disociación celular. La fuente era tipificada mediante inmunofenotipado con citometría de flujo y ensayos de diferenciación (condrogénica, adipogénica, osteogénica). Las células que se utilizaban en los ensayos eran despegadas tras 2-3 pases de cultivo. Todos los procedimientos de laboratorio se realizaron siguiendo protocolos de Buenas Prácticas de Laboratorio.

Alcanzado el pase de cultivo deseado, las células fueron criopreservadas en alícuotas de $5-10 \times 10^6$ células/criotubo en nitrógeno líquido a la espera de ser utilizada en los pacientes incluidos en este estudio. La descongelación de las células se realizó de manera progresiva con la ayuda de un baño María a 37°C .

Para la elaboración de la dosis celular a administrar, una vez despegadas de los frascos de cultivo y descongeladas, se procedía a un conteo celular para obtener dosis de unos 15 millones por ojo. La dosis total se suspendía en un volumen de 1ml de PBS y se introducía en envases estériles que se trasportaban en hielo desde el laboratorio hasta el HCV, coordinando los equipos de manera que las células se administren dentro de las 2 horas siguientes a haber sido preparadas. Para la infusión celular al paciente, la dosis celular se dividía en dos jeringuillas de insulina de 1 ml, una con 0.3 ml (unos 5 millones de células) y otra con 0.7 ml (unos 10 millones de células) destinadas a su inyección en glándula principal y glándula de membrana nictitante, respectivamente (Fig.10).

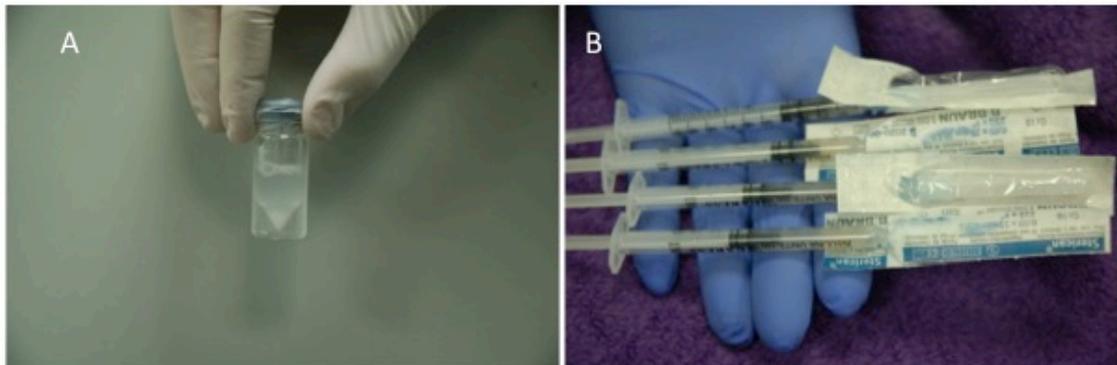


Figura 10: Forma de presentación de las células madre. **A=** vial estéril. **B=** jeringuillas de 1 ml para su aplicación.

2.4 Administración de la terapia con células madre

A los animales del grupo TC se les administró una sesión única de células mesenquimales en dosis preparadas, tal y como se describe en el apartado anterior y mediante una aguja de 20G. Para ello se realizó una sedación mediante dexmedetomidina a una dosis de 3 a 5 microgramos/ Kg intramuscular junto con butorfanol a 0,2 mg/Kg y mantenimiento con isoflurano mediante mascarilla. Posteriormente se procedió al lavado de los párpados mediante povidona iodada diluida y suero Ringer Lactato y se colocó al paciente en decúbito lateral. Para la

inoculación en la glándula orbital se tomaron las referencias del trabajo de Park y colaboradores²⁸, en la zona superotemporal del globo ocular, entre el músculo dorsal y el recto lateral. Para la de la membrana nictitante se exteriorizó dicha estructura y se introdujo la aguja por su cara bulbar hasta alcanzar la base del cartílago (Fig.11). Una vez finalizada la inoculación se aplicó un carbómero en pomada y se revertió a los pacientes mediante atipamezol subcutáneo.

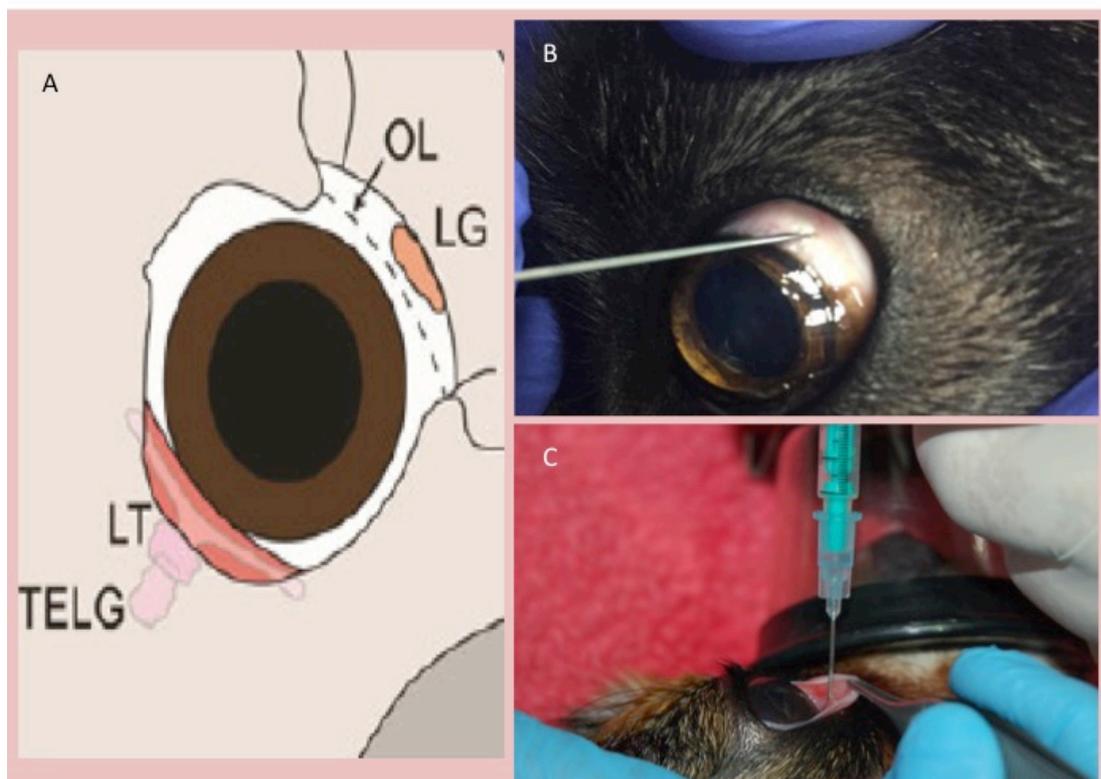


Figura 11: Referencias de localización anatómica de ambas glándulas. En Park S et al, 2016²⁸ (A). Aplicación de la terapia en la glándula orbital (B) y en la membrana nictitante (C). LG= glándula lacrimal principal, LT= tejido linfóide, OL= ligamento orbital, TELG= glándula membrana nictitante.

2.5 Recogida de datos

La evolución de los pacientes, tanto del grupo control como el experimental se realizó a los 45 días, 3, 6, 9 y 12 meses del día de inclusión. En cada punto de control (P) se usó una hoja Word de seguimiento que se rellenaba con las variaciones sufridas a lo largo de los meses (Fig.8b). Para ello se realizaba una exploración oftalmológica completa con seguimiento fotográfico.

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos durante el estudio se realizó mediante el programa IBM SPSS Statistics 24.0.0

La primera parte del estudio se centro en la elaboración del sistema de clasificación estudiando la fiabilidad y concordancia de la escala clínica entre los tres observadores. Para ello uso:

- a. Contraste de hipótesis mediante T Student por pares: El contraste de hipótesis que se hizo en este caso fue suponer que las variables se medían igual por lo diferentes observadores frente a que no.
- b. Consistencia interna: alfa de Cronbach. Midió la homogeneidad de los enunciados de un instrumento indicando la relación entre ellos. La interpretación global es: < 0,40 – Pobre; 0,40 – 0,59 – Suficiente; 0,60 – 0,74 – Bueno; 0,75 – 1 – Excelente.
- c. Concordancia entre observadores:
 - i. Kappa: índice de concordancia entre operadores (por parejas): >0.8= excelente; 0.6-0.8= bueno; 0.4-0.6= aceptable. No paramétrica.
 - ii. Coeficiente de correlacion intraclase: establece el grado de acuerdo/consistencia entre 2 o más evaluaciones sobre el mismo número de sujetos. En todo caso la interpretación global es: < 0,40 – Pobre; 0,40 – 0,59 – Suficiente; 0,60 – 0,74 – Bueno; 0,75 – 1 – Excelente.
- d. Validez del contenido y de criterio: para validar el contenido de la escala se realizó un consenso entre el equipo investigador para decidir que variables se iban a tener en cuenta. Para la validez del criterio, al carecer en medicina veterinaria de una escala de referencia, se recurrió a lo publicado en medicina humana² y en veterinaria.¹⁴⁸

La segunda parte del estudio consistió en:

1. **Procesado de datos**: los datos se procesaron primero directamente. Luego se hizo una recodificación para que todas las variables fuesen de 1 a 4 (la escala de 0 a 3 impedía hacer la recodificación a base 1). Finalmente, a partir de los recodificados de 1-4 se dividió el valor de cada parámetro para cada paciente en cada punto de control por el valor que tuviese en el punto de inclusión (P0), de

manera que todas las variables fueron comparables a partir del mismo punto inicial y se valoró la reducción que experimentaron respecto a ese valor (indexo con el punto de inicio); es decir el grado de mejoría. Adicionalmente, a partir de esas bases de datos, se realizó una trasposición tomando como base la variable “Seguimiento” para poder realizar los análisis de medidas repetidas.

2. **Análisis de los datos:** se realizaron pruebas para el grupo terapia médica y el grupo terapia celular por separado y luego para la comparación entre ambos.
 - a. Análisis de los grupos de tratamiento por separado: en este apartado se usaron los datos directos. Tanto en el grupo terapia médica como en el de terapia celular se analizaron:
 - i. Influencia de la conformación racial, sexo y ojo (D-I) en todas las variables: T de Student.
 - ii. Relaciones entre variables cuantitativas: correlación de Pearson
 - iii. Comportamiento de las variables a lo largo del estudio: para valorar si la terapia fue eficaz o no al comparar los puntos de seguimiento. Se realizó ANOVA de medidas repetidas con los valores directos.
 - b. Análisis de comparación entre grupos de tratamiento: en este apartado se usó los valores indexados. Se estudió mediante:
 - i. ANOVA de medidas repetidas, usando un GLM con “Seguimiento” como factor intrasujeto y “Terapia” como factor intersujeto. Estos ANOVA generaron el análisis general y permitieron determinar si hay o no un efecto “Seguimiento” y un efecto “Terapia”. Se crearon tablas de comparación entre los puntos de seguimiento y gráficos de líneas para comparar terapias a lo largo del tiempo.
3. T de Student en cada punto de seguimiento: permitieron comparar para cada punto de seguimiento si existían diferencias significativas entre las dos terapias.

En todos los casos el nivel de significación adoptado fue del 95% ($p < 0.05$)

ETIQUETA IDENTIFICATIVA DEL PACIENTE

Fecha: _____

Punto control: 0 (Candidato)

Evaluador:

- Alejandro Bayón.
 Eva Giménez.
 Otro: _____

DATOS DEL ENSAYO CLÍNICO

Nº ID Ensayo Clínico: 16-PE-GR-ALO-02.

IP: Dr. Alejandro Bayón del Río.

Fuente celular: Células madre derivadas del tej. Adiposo (AD-MSC). **Origen:** alogénico. **Nº Tto previsto:** 1. **Dosis (D):** 15x10⁶ AD-MSC/ojo. **D. Total/paciente:** 30x10⁶ AD-MSC. **Vía y volumen Adm.:** Subconjuntival/ Intraglandular (0,6 ml gl principal y 0,3 ml glacesoria).

DATOS DE CONTACTO DEL PROPIETARIO

NOMBRE 1: _____ Tlf: _____ e-mail: _____

NOMBRE 2: _____ Tlf: _____ e-mail: _____

DATOS DE CONTACTO DEL VETERINARIO REMITENTE (Si procede)

NOMBRE: _____ Tlf: _____ e-mail: _____

CLÍNICA/HOSPITAL: _____ Tlf: _____ e-mail: _____

ANAMNESIS Y EXAMEN FÍSICO – VARIABLES GENERALES

EDAD: _____ PESO: _____ C. CORPORAL (1-9/9): _____ SEXO: ♀ent ♂ent ♀c ♂c

Mucosas: _____ TRC: _____ Pulso: _____ Tª: _____ FR: _____ FC: _____ AC/AP: _____

ANTECEDENTES CLÍNICOS:

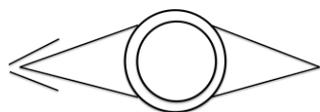
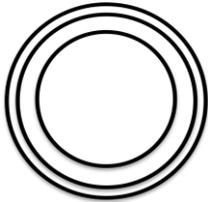
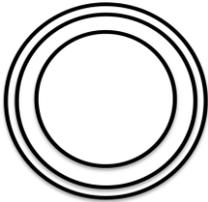
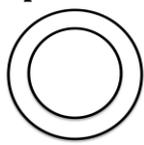
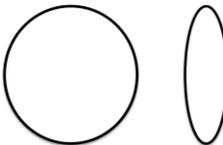
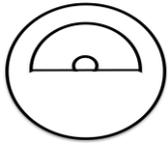
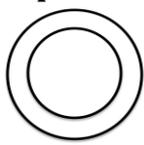
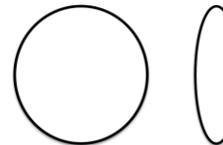
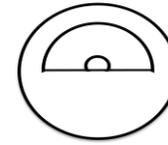
ANTECEDENTES QUIRÚRGICOS:

TRATAMIENTOS ACTUALES:

PRUEBAS A REALIZAR

- Hemograma + Bioquímica + Prot F. Aguda.** (Adjuntar copias de las pruebas).
 Test ELISA-Leishmania. No testado Positivo + / Negativo - **Título:** _____
 Otras: _____

EXPLORACIÓN OFTALMOLÓGICA – VARIABLES ESPECÍFICAS

OJO DERECHO				OJO IZQUIERDO			
Reflejos	Amenaza <input type="checkbox"/>	Dazzle <input type="checkbox"/>		Reflejos	Amenaza <input type="checkbox"/>	Dazzle <input type="checkbox"/>	
	Directo <input type="checkbox"/>	Consensual <input type="checkbox"/>			Directo <input type="checkbox"/>	Consensual <input type="checkbox"/>	
Test Schirmer*	mm/min	0	1 2 3	Test Schirmer*	mm/min	0	1 2 3
Microbiología/ Citología				Microbiología/ Citología			
PIO Aplanamiento mmHg				PIO Aplanamiento mmHg			
Órbita				Órbita			
Párpados		Descarga ocular*		Párpados		Descarga ocular*	
		0	1 2 3			0	1 2 3
Lagrimal	Test TBUT	<input type="checkbox"/> > 5 s	<input type="checkbox"/> < 5 s	Lagrimal	Test TBUT	<input type="checkbox"/> > 5 s	<input type="checkbox"/> < 5 s
Conjuntiva	Hiperemia*	0	1 2 3	Conjuntiva	Hiperemia*	0	1 2 3
Córnea	Pigmento*	0	1 2 3	Córnea	Pigmento*	0	1 2 3
	Vasos*	0	1 2 3		Vasos*	0	1 2 3
	<input type="checkbox"/> Superficiales <input type="checkbox"/> Profundos				<input type="checkbox"/> Superficiales <input type="checkbox"/> Profundos		
	Edema*	0	1 2 3		Edema*	0	1 2 3
	C. Anterior	0	1		C. Anterior	0	1
Fluoresceína <input type="checkbox"/>	Rosa bengala <input type="checkbox"/>	Verde lisamina <input type="checkbox"/>		Fluoresceína <input type="checkbox"/>	Rosa bengala <input type="checkbox"/>	Verde lisamina <input type="checkbox"/>	
C. anterior, Pupila e Iris	Cristalino	Fondo ojo y Vítreo		C. anterior, Pupila e Iris	Cristalino	Fondo ojo y Vítreo	
							
Estadio enfermedad: P.total: /23				Estadio enfermedad: P.total: /23			
<ul style="list-style-type: none"> ○ I. Leve (0-4) ○ II. Moderado (5-11) ○ III. Grave (12-18) ○ IV. Severo (19-23) 				<ul style="list-style-type: none"> ○ I. Leve (0-4) ○ II. Moderado (5-11) ○ III. Grave (12-18) ○ IV. Severo (19-23) 			

COMENTARIOS (Tratamiento médico instaurado, otros datos, etc.):

Figura 8b: Plantilla inicial de los candidatos que recoge el examen oftalmológico completo.

Resultados

En el apartado de resultados se procedió en primer lugar a evaluar la escala clínica mediante una población control. Sobre esta población se realizaron diversos test contando con tres observadores independientes, lo que permitió establecer la fiabilidad y concordancia entre ellos.

Seguidamente se hizo un análisis de la población del estudio, es decir, de los 38 animales que participaron, en los cuales se estudió la raza, sexo, edad, peso, para luego separarlos en aquellos que recibieron terapia médica o celular.

En el día de inclusión se analizó la influencia de la conformación, sexo y ojo en la población total del estudio, la que recibió terapia celular y médica, además de las correlaciones entre las diferentes variables. Y por último se evaluó como afectaba cada tratamiento a cada variable a los largo de los diferentes puntos de control, para luego comparar ambos tratamientos entre sí y determinar la eficacia de las células madre como adyuvante para la QCS seca.

1. FIABILIDAD Y CONCORDANCIA DE LA ESCALA CLÍNICA

La población que se utilizó en este apartado constaba de 13 perros, 26 ojos, con QCS de cualquier origen. Las razas que predominaron fueron los Yorkshire Terrier con un 23,07% seguido del Bulldog Francés y Mestizos con un 15,38% cada uno. La edad media de la población fue de 7,5 años, con un rango de 2 a 16 años, siendo el 61,53% hembras y el 38,46% machos.

Sobre dicha población se realizaron diversos test para medir la fiabilidad y repetitividad los cuales fueron:

- Contraste de hipótesis mediante T Student por pares: en el se planteó que todas las variables se miden de igual forma por los diferentes observadores. Por lo que se espera que dichos valores no den el resultado de rechazar a dicha hipótesis
- Consistencia interna mediante alfa de Cronbach: permitió medir la homogeneidad de los enunciados de las variables por los diferentes observadores. Por lo que se busca que no exista contradicciones dentro de la escala clínica.
- Concordancia mediante el índice Kappa y la correlación intraclase: estableció el grado de armonía entre los diferentes observadores en su forma de puntuar a las diferentes variables y así mismo en cómo se clasifica del paciente.

El contraste de **hipótesis** (Tabla 1) hubo evidencia estadística para decir que la variables “hiperemia conjuntival”, “puntuación total” y “estadio” se evaluaron de forma distinta entre los observadores 1 y 2 con el 3.

Tabla 1: Valores de significación obtenidos de la T Student por pares para verificar la hipótesis de que todas las variables se miden de igual forma por los observadores. Nivel de significación (sombreado azul) < 0.05

T Student por pares	Observador 1-2	Observador 1-3	Observador 2-3
DO	1.00	0.056	0.083
Hiperemia	0.161	0.001	0.007
Pigmento	0.327	1.000	0.574
Vascularización	0.574	0.161	0.096
Edema	0.574	0.185	0.425
Valorar CA	1.000	0.161	0.161
P. Total	0.376	0.000	0.000
Estadio	0.574	0.022	0.043

DO= descarga ocular, CA= cámara anterior, P. Total: puntuación total

La prueba de **alfa de Cronbach** (Tabla 2) mostró unos valores entre 1 y 0,75, por lo tanto, el rango de consistencia fue excelente, mostrando una homogeneidad para los tres observadores sin la evidencia de contradicciones en el enunciado de las diferentes variables.

Tabla 2: Coeficientes obtenidos de la prueba alfa de Cronbach para medir la consistencia interna de los enunciados. Los rangos de interpretación: $< 0,40$ (Pobre); $0,40 - 0,59$ (Suficiente); $0,60 - 0,74$ (Bueno); $0,75 - 1$ (Excelente).

	DO	Hiperemia	Pigmento	Vasos	Edema	Valorar CA	P.Total	Estadio
α Cronbach	0.948	0.901	0.988	0.941	0.968	0.959	0.993	0.942

DO= descarga ocular, CA= cámara anterior, P. Total= puntuación total

El **índice Kappa** (Tabla 3) puso de manifiesto que entre los observadores con una mayor experiencia (observador 1 y 2) la concordancia variaba de buena (0.6-0.8)

a excelente (>0.8), mientras que con el observador 3 hubo una mayor discrepancia. Las variables más afectadas fueron el grado de hiperemia y la puntuación total. Este último se vio afectado ya que la concordancia del sujeto 3 variaba entre buena y aceptable en otras variables con lo que conlleva a que el resultado final sea más bajo.

Tabla 3: Valores obtenidos por el índice Kappa que permite establecer la concordancia entre los diferentes observadores emparejándolos. Los valores de referencia: >0.8 (excelente \rightarrow sombreado azul); $0.6-0.8$ (bueno \rightarrow sombreado morado); $0.4-0.6$ (aceptable); <0.4 (mala)

Kappa	Observador 1-2	Observador 1-3	Observador 2-3
DO	0.777	0.637	0.534
Hiperemia	0.891	0.209	0.205
Pigmento	0.937	0.873	0.821
Vasos	0.827	0.540	0.489
Edema	0.840	0.734	0.675
Valorar CA	1.000	0.821	0.821
P.Total	0.539	0.374	0.251
Estadio	0,790	0,666	0,731

DO= descarga ocular, CA= cámara anterior, P.Total= puntuación total

La **correlación intraclase** (Tabla 4) mostró la tendencia que siguen los observadores. En este caso los resultados variaban de bueno (0.60 a 0.74) a excelente (0.75 a 1), lo que significó que aunque pueda existir alguna variación, la dirección en la tendencia de la gravedad de la enfermedad fue la misma por los diferentes observadores.

Tabla 4: Valores de la correlación intraclase para establecer la armonía entre los diferentes observadores. Su interpretación global: < 0,40 (Pobre); 0,40 – 0,59 (Suficiente); 0,60 – 0,74 (Bueno); 0,75 – 1 (Excelente).

Correlaciones intraclase	Observador 1-2	Observador 1-3	Observador 2-3
DO	0.935	0.839	0.772
Hiperemia	0.955	0.709	0.658
Pigmento	0.994	0.987	0.982
Vasos	0.950	0.824	0.830
Edema	0.933	0.904	0.861
Valorar CA	1.000	0.834	0.834
P.Total	0.984	0.957	0.968
Estadio	0.912	0.827	0.824

DO= descarga ocular, CA= cámara anterior, P. Total= puntuación total

Los resultados obtenidos en este apartado mostraron que a nivel global la hipótesis planteada dio como resultado rechazar que las variables se median de forma distinta, salvo la hiperemia conjuntival; y que el enunciado de las variables fue homogéneo para los diferentes observadores. Ya más concretamente, cuando se compararon entre los observadores por pares se observó que entre los que presentaban una mayor experiencia el nivel de concordancia era mayor que cuando se equiparaba con el de menor nivel. Esto se ve reflejado en ciertas variables, que llegan a afectar a la puntuación total, pero no al estadio de la enfermedad en la que se clasificó al animal.

2. ESTUDIO TERAPEUTICO: población de estudio

En este estudio participaron 38 animales, 76 ojos, que acudieron al servicio de Oftalmología del Hospital Veterinario de la Universidad de Murcia y que fueron diagnosticados de QCS bilateral idiopática.

De la población total el 55,3% eran machos y el 44,7% hembras siendo la media de edad de $8,97 \pm 2,85$ años. En total se incluyeron 15 razas (Tabla 5), donde el Yorkshire Terrier fue la más representada con un 21,1%, seguido del Shih Tzu (15,8%) y Cocker Spaniel (10,5%). El rango de peso oscilaba de 3 a 58 Kg, siendo la media de $12,23 \pm 11,77$ Kg.

Tabla 5: Razas y porcentaje de aparición en la población total del estudio.

	N	Porcentaje
YORKSHIRE TERRIER	8	21,1
SHIH TZU	6	15,8
COCKER SPANIEL	4	10,5
BULLDOG FRANCÉS	3	7,9
BULLDOG INGLÉS	3	7,9
MESTIZO	3	7,9
BICHÓN MALTES	2	5,3
WHWT	2	5,3
BICHÓN HABANERO	1	2,6
CKCS	1	2,6
CHIHUAHUA	1	2,6
COCKER AMERICANO	1	2,6
FILA BRASILEÑO	1	2,6
GRAN DANÉS	1	2,6
SCHNAUZER	1	2,6

WHWT= West Highland White Terrier, CKCS= Cavalier King Charles Spaniel

La composición de los grupos del estudio terapéutico:

- **Grupo terapia celular:** fueron 10 perros, incluyendo 9 razas distintas, con una media de edad de $7 \pm 3,33$ años y un peso de $10,91 \pm 6,29$ Kg. Con respecto al sexo, el número de machos y de hembras fue el mismo.
- **Grupo terapia médica:** fueron 28 perros y estaba compuesto por 12 razas distintas, con una media de edad de $9,68 \pm 2,34$ años y un peso de $12,7 \pm 13,26$ Kg. Este grupo estaba compuesto por 16 machos (57,10%) y por 12 hembras (42,90 %).

Se realizó el T Student y Chi cuadrado para evaluar la homogeneidad de ambas poblaciones con un nivel de significación $p < 0.05$.

Se observó que no hubo diferencias respecto al sexo, conformación, peso y las variables estudiadas a excepción de la hiperemia ($p=0.005$). Esta fue significativamente mayor en el grupo TM (2.32 ± 0.72), respecto al TC (1.75 ± 0.85), al igual que ocurrió con la edad ($p=0.02$). Los animales fueron significativamente más jóvenes en el grupo TC ($7 \pm 3,33$) frente a los de TM ($9,68 \pm 2,34$).

3. ANÁLISIS EN EL DÍA DE INCLUSIÓN

3.1. Grupo terapia celular

En el día de inclusión el 25% se encontraban en el estadio leve (I), el 40% en moderado (II), el 35% en grave (III) y el 0% en severo (IV) (Fig.12).

En este grupo el 60% fueron meso/dolicocefálicos y el 40% braquicefálicos, y con un porcentaje del 50% de machos y hembras. No hubo diferencias que afectaran según su conformación, ni sexo, ni ojo derecho o izquierdo.

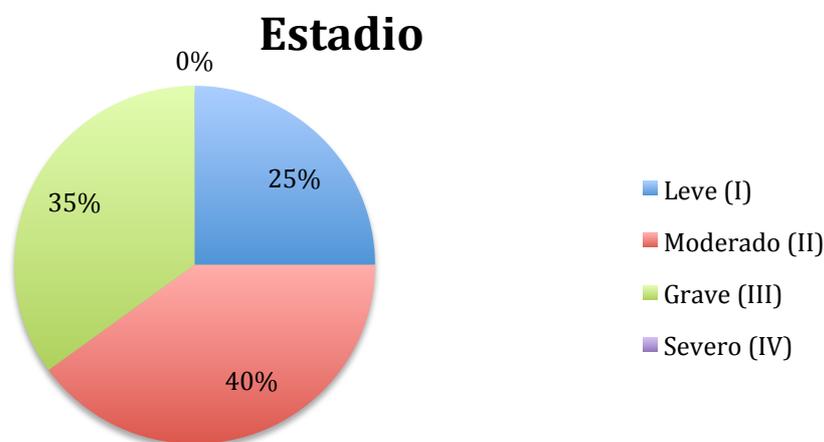


Figura 12: Distribución según el estadio de la población con TC en el día de inclusión

3.2. Grupo terapia médica

En el día de inclusión el 5,35% se encontraban en el estadio leve (I), el 48,21% en moderado (II), el 42,85% en grave (III) y el 3,57% en severo (IV) (Fig.13)



Figura 13: Distribución de la población con TM en los diferentes estadios en el día de inclusión

3.2.1 Influencia de la conformación

En el grupo de terapia médica el 64,28% eran meso/dolicocefálicos y el 35,72% braquicefálicos. Se observó que había diferencias estadísticamente significativas en la edad ($p=0.017$), siendo los braquicefálicos más jóvenes; $8,70\pm 2,15$ años frente a los $10,22\pm 2,25$ años. También esta conformación presentó más vascularización ($p=0.038$) y edema ($p=0.018$) en la superficie corneal. Las medias en la vascularización fueron de $1,85\pm 0,93$ para los braquicefálicos frente a $1,31\pm 0,85$ en los doli/mesocefálicos; y en el edema de $1,80\pm 0,76$ y $1,28\pm 0,74$ respectivamente.

Por otro lado la descarga ocular ($p=0.015$), pigmento corneal ($p=0.008$) y el test colorimétrico ($p=0.026$) fue significativamente mayor en los meso/dolicocefálicos. Las medias para la descarga ocular fueron de $2,19\pm 0,82$ para los meso/dolicocefálicos y de $1,65\pm 0,79$ para los braquicefálicos. En relación al pigmento fue de $1,11\pm 1,26$ y $0,40\pm 0,68$; y en el test colorimétrico de $0,33\pm 0,676$ y $0,05\pm 0,22$ respectivamente.

3.2.2 Influencia del sexo

Se encontraron diferencias con respecto a la edad ($p=0.014$), siendo mayor los machos que las hembras, con $10,31\pm 2,37$ y $8,83\pm 1,99$ años respectivamente.

3.2.3 Influencia del ojo (D-I)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el ojo derecho e izquierdo.

3.4. Estudio de correlación entre variables en ambas poblaciones

Mediante este test vamos a obtener la correlación entre las diferentes variables (Tabla 6 y 7). Se adquiere un valor entre 1 y -1, siendo los valores cercanos a 1 los que indican una fuerte correlación, los cercanos a 0 una baja correlación y los negativos una correlación inversamente proporcional. El valor de significación fue siempre inferior a 0.05.

Tabla 6: Estudio de las correlaciones de la población con tratamiento médico en el día de inclusión.

	Edad	Peso	TS	DO	Hiperemia	Pigmento	Vasos	Edema	T.C	CA	P.Total	Estadio
Edad		-,192	-,086	,047	-0.002	-,280	-,120	,183	,263	-,229	-,093	-,071
Peso			,185	,292	,319	,400	-0.025	-0.170	,125	,292	,290	,229
TS				,678	,589	,436	,319	0.113	,447	,343	,810	,714
DO					,672	,520	,311	-0.028	,421	,471	,813	,664
Hiperemia						0.259	,555	,279	,347	,193	,790	,731
Pigmento							-0.088	-,556	,304	,774	,551	,476
Vasos								,582	,156	,107	,612	,589
Edema									,039	-,344	,209	,225
T.C										,346	,576	,541
CA											,553	,501
P.Total												,899

TS= Test de Schirmer, DO= descarga ocular, T.C= test colorimétrico, CA= cámara anterior, P. Total= puntuación total

Las correlaciones fueron positivas, menos en el caso de la edad con la variable del pigmento, por el cual este disminuye de cantidad a medida que los animales de este grupo envejecen.

Los resultados también mostraron que con la edad la capacidad de re-epitelización corneal se encontraba disminuida. En el caso de la hiposecreción, la correlación fue positiva con el resto de variables, por lo que cuanto mayor sea esta, más signos clínicos presentaban los animales afectados de QCS. Lo mismo ocurre con el resto de variables, a excepción del pigmento y el edema. Entre ellos la correlación fue negativa y es debido a que en el caso de que la córnea este más pigmentada, hace que no se visualice la posible presencia de edema.

La puntuación total presenta una fuerte correlación con el test de Schirmer, descarga ocular, hiperemia, pigmento, vascularización y test colorimétrico. Indicativo de que animales con un mayor puntuación, es decir, estadios mas graves, presentan signos clínicos más severos.

Tabla 7: Estudio de las correlaciones de la población con tratamiento celular en el día de inclusión.

	Edad	Peso	TS	DO	Hiperemia	Pigmento	Vasos	Edema	T.C	CA	P.Total	Estadio
Edad		,281	-,364	,018	-,153	,050	-,276	-,066	-,290	,110	-,169	-,309
Peso			-,090	-,223	,232	-,078	-,236	,080	,157	-,342	-,100	-,172
TS				,780	,737	,477	,745	,436	,275	,581	,891	,905
DO					,771	,646	,768	,440	,107	,805	,941	,817
Hiperemia						,474	,703	,549	,346	,453	,875	,746
Pigmento							,316	-,161	,313	,545	,622	,655
Vasos								,530	-,045	,561	,846	,797
Edema									-,096	,404	,544	,401
T.C										-,132	,216	,269
CA											,740	,676
P.Total												,928

TS= Test de Schirmer, DO= descarga ocular, T.C= test colorimétrico, CA= cámara anterior, P. Total= puntuación total

Los animales presentaron correlaciones positivas en todas las variables estudiadas. Por lo tanto cuanto más grave era la hiposecreción lacrimal, más severos eran los signos clínicos y por lo tanto presentaban puntuaciones superiores. Así mismo, esto dificultaba la visualización de las estructuras intraoculares y por lo tanto generaba déficit visuales en los pacientes.

4. ANALÍISIS DE CADA VARIABLE A LO LARGO DE LOS DIFERENTES PUNTOS DE CONTROL

En este apartado se va a estudiar la evolución de cada variable a lo largo de los diferentes puntos de control, tanto en el grupo de terapia médica como el de terapia celular. Para ello se ha usado ANOVA de medidas repetidas con un nivel de significación inferior a 0.05 y 0.01. El *test de Schirmer* (Tabla 8) presentó variaciones estadísticamente significativas a partir del punto de control 1 (45 días), con un aumento de la producción lacrimal. Los animales con TM se mantuvieron estables hasta el punto de control 3 (6 meses) para luego empeorar de forma significativa. En TC los animales presentaron su mejor valor en el punto de control 2 (3 meses), llevando una tendencia a empeorar a partir de los 6 meses, pero que no se hizo significativa hasta el control 5.

Tabla 8: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala del Test de Schirmer (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Test Schirmer							Terapia Celular: Test Schirmer						
	P0 (1.94± 0.12)	P1 (1.37± 0.15)	P2 (1.40± 0.14)	P3 (1.58± 0.13)	P4 (1.63± 0.14)	P5 (1.65± 0.13)	P0 (1.89± 0.25)	P1 (1.07± 0.30)	P2 (0.91± 0.30)	P3 (1.23± 0.32)	P4 (1.07± 0.31)	P5 (1.31± 0.29)	
P0 (1.94± 0.12)	1	0.000	0.000	0.008	0.035	0.064	1	0.001	0.003	0.009	0.006	0.030	P0 (1.89± 0.25)
P1 (1.37± 0.15)		1	1.000	0.055	0.046	0.019		1	0.578	0.556	1.000	0.355	P1 (1.07± 0.30)
P2 (1.40± 0.14)			1	0.021	0.037	0.016			1	0.169	0.418	0.014	P2 (0.91± 0.30)
P3 (1.58± 0.13)				1	1.000	1.000				1	0.438	0.721	P3 (1.23± 0.32)
P4 (1.63± 0.14)					1	1.000					1	0.082	P4 (1.07± 0.31)
P5 (1.65± 0.13)						1						1	P5 (1.31± 0.29)

Respecto al grado de *descarga ocular* (Tabla 9) los animales con TM presentaron una mejoría estadísticamente significativa en el punto 1 (45 días), manteniéndose estable hasta el punto de control 3 (6 meses) (Fig.14), a partir del cual vuelve a empeorar hasta los 9 meses, en cual ya no hubo diferencias significativas con los valores iniciales. En TC se observó una mejoría significativa a partir de los 45 días, que se fue acentuando hasta alcanzar el mejor valor el punto de control 3, a partir del cual comenzó el empeoramiento hasta que no hubo diferencias significativas con el inicio.

Tabla 9: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala de la descarga ocular (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Descarga ocular							Terapia Celular: Descarga ocular						
	P0 (1.92± 0.11)	P1 (1.51 ± 0.10)	P2 (1.59 ± 0.10)	P3 (1.66 ± 0.10)	P4 (1.75 ± 0.10)	P5 (1.80 ± 0.10)	P0 (1.57 ± 0.22)	P1 (0.76 ± 0.19)	P2 (0.81 ± 0.23)	P3 (0.71 ± 0.23)	P4 (0.88 ± 0.19)	P5 (1.19 ± 0.20)	
P0 (1.92± 0.11)	1	0.000	0.001	0.030	0.648	1.000	1	0.005	0.001	0.000	0.001	0.080	P0 (1.57 ± 0.22)
P1 (1.51± 0.10)		1	0.758	0.386	0.023	0.002		1	0.851	0.826	0.584	0.068	P1 (0.76 ± 0.19)
P2 (1.59± 0.10)			1	1.000	0.145	0.010			1	0.684	0.709	0.013	P2 (0.81 ± 0.23)
P3 (1.66± 0.10)				1	1.000	0.218				1	0.229	0.029	P3 (0.71 ± 0.23)
P4 (1.75± 0.10)					1	1.000					1	0.044	P4 (0.88 ± 0.19)
P5 (1.80± 0.10)						1						1	P5 (1.19 ± 0.20)

El grado de *hiperemia conjuntival* (Tabla 10) presentó diferencias estadísticamente significativas entre el punto 1 y el resto de los puntos de control, por lo que tras la inoculación se observó una mejoría inicial con TM, que luego se mantuvo estable a lo largo del estudio. Los TC presentaron una mejoría significativa a partir del punto de control 1, que se mantuvo hasta los 6 meses, a partir del cual empezó a seguir una tendencia de empeoramiento durante los tres siguientes meses hasta no haber diferencias significativas con el punto de inclusión (P0).

Tabla 10: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala de la hiperemia conjuntival (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Hiperemia							Terapia Celular: Hiperemia						
	P0 (2.30± 0.10)	P1 (1.76 ± 0.12)	P2 (1.82 ± 0.11)	P3 (1.86 ± 0.11)	P4 (1.88 ± 0.11)	P5 (1.88 ± 0.11)	P0 (1.86 ± 0.20)	P1 (0.79 ± 0.18)	P2 (0.82 ± 0.19)	P3 (1.04 ± 0.19)	P4 (1.32 ± 0.30)	P5 (1.44 ± 0.29)	
P0 (2.30± 0.10)	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1	0.000	0.000	0.000	0.051	0.102	P0 (1.86 ± 0.20)
P1 (1.76± 0.12)		1	1.000	1.000	0.691	0.691		1	0.893	0.175	0.092	0.034	P1 (0.79 ± 0.18)
P2 (1.82± 0.11)			1	1.000	1.000	1.000			1	0.055	0.087	0.037	P2 (0.82 ± 0.19)
P3 (1.86± 0.11)				1	1.000	1.000				1	0.272	0.147	P3 (1.04 ± 0.19)
P4 (1.88± 0.11)					1	1.000					1	0.400	P4 (1.32 ± 0.30)
P5 (1.88± 0.11)						1						1	P5 (1.44 ± 0.29)

No se observaron variaciones significativas en el grado de *pigmento corneal* en los animales tratados con TM. En el grupo tratado con TC se observó una mejoría significativa únicamente a los 3 meses respecto al punto de inicio del estudio (Tabla 11).

Tabla 11: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala del pigmento corneal (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Pigmento							Terapia Celular: Pigmento						
	P0 (0.75 ± 0.15)	P1 (0.67± 0.13)	P2 (0.68 ± 0.14)	P3 (0.70 ± 0.14)	P4 (0.67 ± 0.14)	P5 (0.67 ± 0.14)	P0 (0.78 ± 0.24)	P1 (0.70 ± 0.21)	P2 (0.58 ± 0.20)	P3 (0.61 ± 0.22)	P4 (0.66 ± 0.21)	P5 (0.77 ± 0.28)	
P0 (0.75 ± 0.15)	1	0.75 8	1.000	1.000	1.000	1.000	1	0.130	0.031	0.130	0.300	0.924	P0 (0.78 ± 0.24)
P1 (0.67 ± 0.13)		1	1.000	1.000	1.000	1.000		1	0.136	0.401	0.721	0.527	P1 (0.70 ± 0.21)
P2 (0.68 ± 0.14)			1	1.000	1.000	1.000			1	0.527	0.401	0.080	P2 (0.58 ± 0.20)
P3 (0.70 ± 0.14)				1	1.000	1.000				1	0.541	0.109	P3 (0.61 ± 0.22)
P4 (0.67 ± 0.14)					1	1.000					1	0.241	P4 (0.66 ± 0.21)
P5 (0.67 ± 0.14)						1						1	P5 (0.77 ± 0.28)

El grado de *neovascularización corneal* (Tabla 12) presentó una mejoría significativa solo en el punto 1 (45 días) de los animales tratados con TM, para luego mantenerse estable a lo largo de los meses restantes. En los animales con TC la tendencia de mejoría apareció también en el punto de control 1, pero no fue significativa hasta el tercer mes y se mantuvo estable durante 6 meses más para luego seguir una tendencia negativa hasta empeorar en el último punto de control.

Tabla 12: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala de la vascularización corneal (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Vascularización							Terapia Celular: Vascularización						
	P0 (1.57± 0.12)	P1 (1.35 ± 0.101)	P2 (1.37 ± 0.09)	P3 (1.38 ± 0.09)	P4 (1.41 ± 0.09)	P5 (1.41 ± 0.09)	P0 (1.23 ± 0.26)	P1 (1.04 ± 0.21)	P2 (0.92 ± 0.19)	P3 (0.96 ± 0.22)	P4 (1.20 ± 0.23)	P5 (1.52 ± 0.28)	
P0 (1.57± 0.12)	1	0.015	0.194	0.362	0.462	0.462	1	0.080	0.044	0.061	0.838	0.176	
P1 (1.35± 0.101)		1	1.000	1.000	1.000	1.000		1	0.136	0.401	0.307	0.029	
P2 (1.37± 0.09)			1	1.000	1.000	1.000			1	0.527	0.061	0.013	
P3 (1.38± 0.09)				1	1.000	1.000				1	0.082	0.017	
P4 (1.41± 0.09)					1	1.000					1	0.006	
P5 (1.41± 0.09)						1						1	

En el grado *edema corneal* (Tabla 13) los animales con TM presentaron diferencias estadísticamente significativas a los 45 días, para luego mantenerse estable hasta los 6 meses y a partir de ahí presentar una tendencia de empeoramiento.

Los animales con TC mostraron una tendencia de mejora en el punto de control 1, pero no fue hasta los 3 meses cuando se hizo significativa, manteniéndose con valores favorables durante 3 meses más, a partir del cual empezó a empeorar de forma significativa

Tabla 13: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala del edema corneal (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Edema							Terapia Celular: Edema						
	P0 (1.53± 0.10)	P1 (1.34 ± 0.08)	P2 (1.35 ± 0.09)	P3 (1.38 ± 0.09)	P4 (1.41 ± 0.09)	P5 (1.42 ± 0.09)	P0 (1.35 ± 0.18)	P1 (1.06 ± 0.19)	P2 (0.89 ± 0.14)	P3 (0.94 ± 0.17)	P4 (1.25 ± 0.15)	P5 (1.48 ± 0.20)	
P0 (1.53± 0.10)	1	0.039	0.057	0.115	0.216	0.607	1	0.089	0.007	0.013	0.469	0.375	P0 (1.35 ± 0.18)
P1 (1.34± 0.08)		1	1.000	1.000	1.000	1.000		1	0.299	0.516	0.335	0.035	P1 (1.06 ± 0.19)
P2 (1.35± 0.09)			1	1.000	1.000	1.000			1	0.734	0.040	0.008	P2 (0.89 ± 0.14)
P3 (1.38± 0.09)				1	1.000	1.000				1	0.044	0.002	P3 (0.94 ± 0.17)
P4 (1.41± 0.09)					1	1.000					1	0.082	P4 (1.25 ± 0.15)
P5 (1.42± 0.09)						1						1	P5 (1.48 ± 0.20)

En los valores del test colorimétrico (Tabla 14) los animales con TM no presentaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de todo el estudio. En el caso de los pacientes con TC se apreció un empeoramiento significativo puntual a los nueve meses del tratamiento.

Tabla 14: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala del test colorimétrico (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Test Colorimétrico							Terapia Celular: Test Colorimétrico						
	P0 (0.19± 0.07)	P1 (0.00 ± 0.00)	P2 (0.00 ± 0.00)	P3 (0.00 ± 0.00)	P4 (0.00 ± 0.00)	P5 (0.00 ± 0.00)	P0 (0.08 ± 0.05)	P1 (0.00 ± 0.00)	P2 (0.03 ± 0.05)	P3 (0.07 ± 0.07)	P4 (0.20 ± 0.08)	P5 (0.03 ± 0.05)	
P0 (0.19± 0.07)	1	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	1	0.130	0.541	0.898	0.300	0.541	P0 (0.08 ± 0.05)
P1 (0.00± 0.00)		1	1.000	1.000	1.000	1.000		1	0.527	0.355	0.031	0.527	P1 (0.00 ± 0.00)
P2 (0.00± 0.00)			1	1.000	1.000	1.000			1	0.527	0.130	1.000	P2 (0.03 ± 0.05)
P3 (0.00± 0.00)				1	1.000	1.000				1	0.285	0.527	P3 (0.07 ± 0.07)
P4 (0.00± 0.00)					1	1.000					1	0.130	P4 (0.20 ± 0.08)
P5 (0.00± 0.00)						1						1	P5 (0.03 ± 0.05)

En la valoración de la cámara anterior (Tabla 15) no se observaron diferencias en los animales con TM, mientras que los tratados con TC se evidenció un empeoramiento significativo entre el control a los 3 y 12 meses.

Tabla 15: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala de valoración de la cámara anterior (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Cámara anterior							Terapia Celular: Cámara anterior						
	P0 (0.25± 0.06)	P1 (0.12 ± 0.04)	P2 (0.12 ± 0.04)	P3 (0.13 ± 0.05)	P4 (0.12 ± 0.04)	P5 (0.12 ± 0.04)	P0 (0.22 ± 0.11)	P1 (0.08 ± 0.05)	P2 (0.03 ± 0.05)	P3 (0.11 ± 0.07)	P4 (0.16 ± 0.06)	P5 (0.31 ± 0.11)	
P0 (0.25± 0.06)	1	0.141	0.141	0.206	0.141	0.141	1	0.159	0.080	0.241	0.597	0.130	P0 (0.22 ± 0.11)
P1 (0.12± 0.04)		1	0.141	1.000	1.000	1.000		1	0.541	0.527	0.130	0.055	P1 (0.08 ± 0.05)
P2 (0.12± 0.04)			1	1.000	1.000	1.000			1	0.130	0.147	0.023	P2 (0.03 ± 0.05)
P3 (0.13± 0.05)				1	1.000	1.000				1	0.541	0.080	P3 (0.11 ± 0.07)
P4 (0.12± 0.04)					1	1.000					1	0.159	P4 (0.16 ± 0.06)
P5 (0.12± 0.04)						1						1	P5 (0.31 ± 0.11)

Respecto a la *puntuación total* (Tabla 16), los animales con TM mostraron diferencias significativas a partir del punto 1 (45 días) y se mantuvo estable hasta los 6 meses de iniciar el tratamiento tópico. Posteriormente fueron empeorando de forma progresiva, pero manteniéndose en unos valores más favorables que no llegaron a los iniciales del estudio.

En TC los pacientes mostraron mejoría a partir del punto 1, alcanzando su máxima mejoría a los 3 meses y prolongando una estabilidad durante 3 meses más. Es a partir de los seis meses cuando empezaron a empeorar de forma progresiva hasta que en el último control no hubo diferencias significativas con los valores iniciales del estudio.

Tabla 16: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala de la puntuación total (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Puntuación total							Terapia Celular: Puntuación total						
	P0 (10.5 ± 0.54)	P1 (8.19 ± 0.56)	P2 (8.36 ± 0.55)	P3 (8.71 ± 0.53)	P4 (8.89 ± 0.53)	P5 (8.98 ± 0.53)	P0 (9.00 ± 1.18)	P1 (5.56 ± 0.96)	P2 (5.02 ± 1.05)	P3 (5.71 ± 1.16)	P4 (6.67 ± 1.16)	P5 (7.98 ± 1.35)	
P0 (10.50 ± 0.54)	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1	0.000	0.000	0.000	0.009	0.245	P0 (9.00 ± 1.18)
P1 (8.19± 0.56)		1	1.000	0.052	0.008	0.002		1	0.400	0.834	0.214	0.021	P1 (5.56 ± 0.96)
P2 (8.36± 0.55)			1	0.105	0.034	0.010			1	0.172	0.023	0.000	P2 (5.02 ± 1.05)
P3 (8.71± 0.53)				1	1.000	0.441				1	0.151	0.006	P3 (5.71 ± 1.16)
P4 (8.89± 0.53)					1	1.000					1	0.008	P4 (6.67 ± 1.16)
P5 (8.98± 0.53)						1						1	P5 (7.98 ± 1.35)

En lo que corresponde al *estadio* (Tabla 17) en los animales con TM la media inicial era de 2.436 ± 0.093 , observándose que fue mejorando de forma significativa, pero sin llegar a alcanzar un estadio I, sino que se mantuvieron estables durante el resto de puntos de control del estudio. En los animales con TC la media inicial fue de $2,214 \pm 0.186$, mejorando de forma significativa hasta alcanzar el valor mínimo a los 3 meses (Fig.15,16 y 17). Este valor reflejó que un porcentaje de pacientes alcanzaron el estadio I tras la aplicación de las células madre. Posteriormente, a partir de los 6 meses los animales fueron empeorando de forma significativa, sobre todo en los últimos puntos de control.

Tabla 17: Niveles de significación resultantes de la comparación de los valores de escala del estadio (escala 0-3) entre los diferentes puntos de control (P0-P5, medias y desviación estándar) en pacientes con tratamiento médico (TM) y celular (TC). Sombreado azul claro : $p < 0.05$; sombreado azul oscuro: $p < 0.01$

Terapia Médica: Estadio							Terapia Celular: Estadio						
	P0 (2.43± 0.09)	P1 (2.06± 0.09)	P2 (2.11± 0.09)	P3 (2.21± 0.08)	P4 (2.18± 0.09)	P5 (2.21± 0.08)	P0 (2.21± 0.18)	P1 (1.61± 0.15)	P2 (1.41± 0.17)	P3 (1.61± 0.17)	P4 (1.77± 0.21)	P5 (1.97± 0.19)	
P0 (2.43± 0.09)	1	0.000	0.000	0.006	0.006	0.011	1	0.001	0.000	0.001	0.013	0.136	P0 (2.21± 0.18)
P1 (2.06± 0.09)		1	1.000	0.218	1.000	0.504		1	0.105	1.000	0.369	0.040	P1 (1.61± 0.15)
P2 (2.11± 0.09)			1	0.414	1.000	1.000			1	0.031	0.005	0.000	P2 (1.41± 0.17)
P3 (2.21± 0.08)				1	1.000	1.000				1	0.223	0.019	P3 (1.61± 0.17)
P4 (2.18± 0.09)					1	1.000					1	0.031	P4 (1.77± 0.21)
P5 (2.21± 0.08)						1						1	P5 (1.97± 0.19)

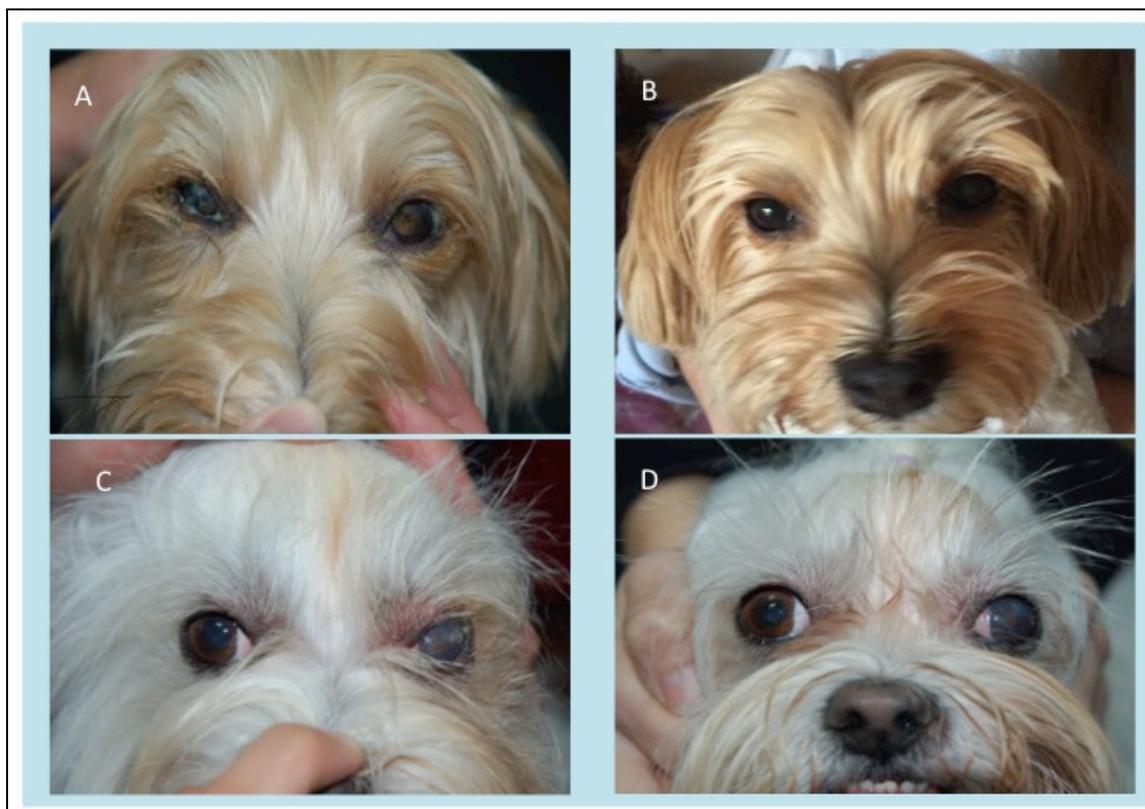


Figura 14: Evolución de la descarga ocular en dos pacientes tratados mediante terapia celular. **A=** paciente 1 en el día de inclusión. **B=** paciente 1 a los 3 meses de la inyección. **C=** paciente 2 en el día de inclusión. **D=** paciente 2 a los 3 meses de la inyección

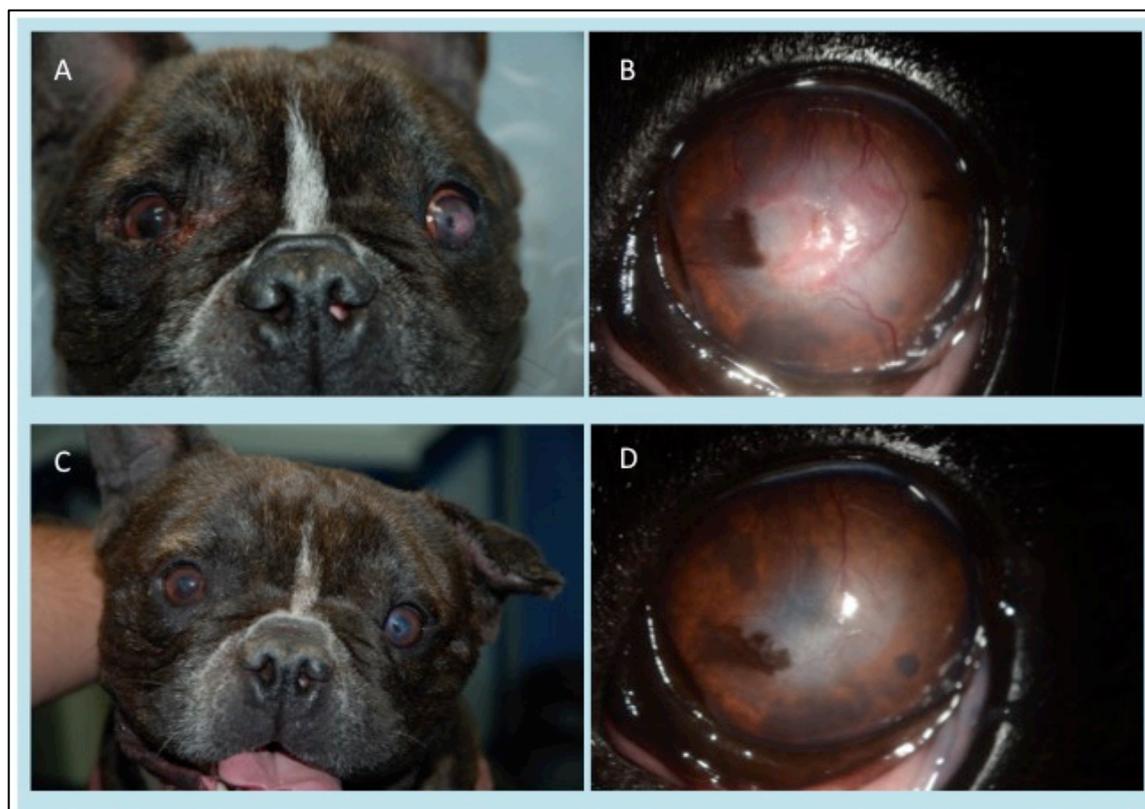


Figura 15: Evolución de un paciente con terapia celular. **A y B=** estadio grave en el día de inclusión. **C y D=** estadio leve a los 3 meses

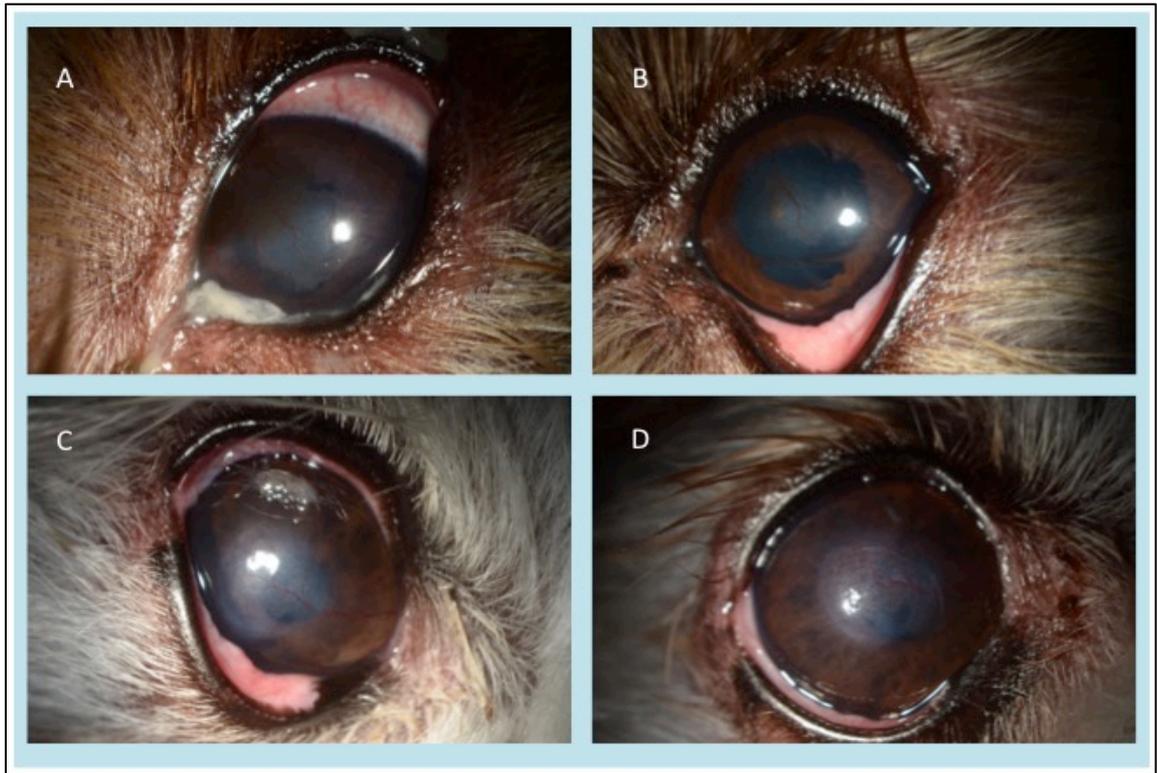


Figura 16: Evolución de dos pacientes con terapia celular. **A=** paciente 1 (Yorkshire Terrier) en el día de inclusión. **B=** paciente 1 a los 3 meses de la inyección. **C=** paciente 2 (Bichón Maltés) en el día de inclusión. **D=** paciente 2 a los 6 meses de la inyección.

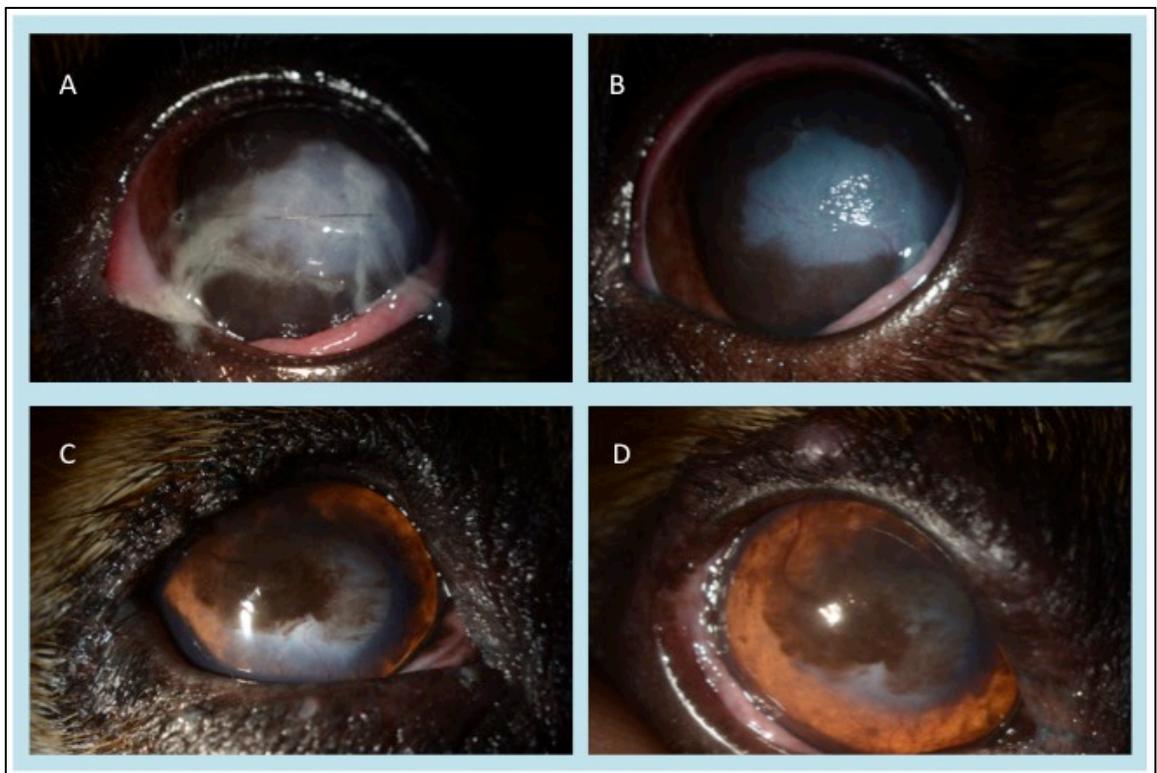


Figura 17: Evolución de dos pacientes con terapia celular. **A=** paciente 1 (CKCS) en el día de inclusión. **B=** paciente 1 a los 3 meses de la inyección. **C=** paciente 2 (Mestizo) en el día de inclusión. **D=** paciente 2 a los 3 meses de la inyección.

5. ANÁLISIS DE COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE TRATAMIENTO

Con objeto de poder evaluar las posibles diferencias en los beneficios inducidos por cada una de las estrategias de tratamiento (médico vs terapia celular) de una forma más directa, se planteó un análisis comparando los datos en cada punto de control obtenidos en los dos grupos. Para ello, todos los valores de las variables de estudio se indexaron al valor inicial (punto de inclusión) de manera que la diferencia respecto a éste representa aumento (si el valor es mayor que 1) o disminución (si es menor que 1) respecto al inicial, siendo mayor la diferencia cuanto más se aleje de 1. Con esta nueva base de datos se realizaron comparaciones por pares /T de Student entre los dos grupos de estudio para cada punto de control (Tabla 18)

Los resultados del análisis muestran diferencias estadísticamente significativas en algunas variables como la descarga ocular, hiperemia, edema, test colorimétrico, puntaje total y estadios. Tanto en la descarga ocular, la hiperemia, el puntuación total y la clasificación en 4 estadios muestran que la terapia celular da mejores medias y que estas se mantienen más estables durante los puntos de control.

El resto de variables muestran una tendencia de mejora, obteniendo mejores resultados mediante la terapia celular según las medias, aunque no son estadísticamente significativas.

Para visualizar mejor el comportamiento de las variables en los diferentes puntos de seguimiento se ha extrapolado la información de las siguientes gráficas (Tabla 18 a y b).

Tabla 18a: Resultados de la comparación entre el grupo terapia médica (TM) y celular (TC) del grado de mejoría obtenida en cada punto de control respecto a la inclusión (valores indexados al punto de inclusión) para cada una de las variables del estudio. Se incluyen los valores medios y desviación estándar del grado de mejoría para cada variable, así como el nivel de significación. **Sombreado verde claro:** P<0.05; **sombreado verde oscuro:** P<0.01

	T.Schirmer		Descarga		Hiperemia		Pigmento		Vasos		Edema		Test color.		Punt. Total		Estadío	
	TM	TC																
P0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P1	0.828± 0.306	0.795± 0.92	0.861± 0.210	0.758± 0.415	0.819± 0.190	0.591± 0.170	0.974± 0.082	0.987± 0.055	0.937± 0.134	0.941± 0.121	0.949± 0.195	0.879± 0.379	0.907± 0.215	0.975± 0.111	0.738± 0.176	0.617± 0.447	0.848± 0.198	0.825± 0.348
	0.702		0.158		0.000		0.523		0.903		0.295		0.188		0.093		0.718	
P2	0.840± 0.280	0.745± 0.367	0.886± 0.197	0.783± 0.337	0.845± 0.169	0.650± 0.239	0.979± 0.076	0.945± 0.138	0.964± 0.202	0.912± 0.161	0.955± 0.191	0.850± 0.344	0.907± 0.215	1.025± 0.255	0.768± 0.158	0.567± 0.277	0.878± 0.185	0.733± 0.261
	0.236		0.103		0.000		0.189		0.306		0.097		0.050		0.000		0.009	
P3	0.913± 0.250	0.800± 0.290	0.916± 0.212	0.691± 0.281	0.866± 0.162	0.754± 0.249	0.985± 0.090	0.970± 0.185	0.982± 0.245	0.925± 0.157	0.967± 0.183	0.833± 0.357	0.907± 0.215	1.075± 0.335	0.821± 0.145	0.614± 0.279	0.919± 0.151	0.800± 0.239
	0.099		0.000		0.026		0.655		0.335		0.036		0.013		0.000		0.012	
P4	0.928± 0.254	0.812± 0.423	0.952± 0.214	0.775± 0.369	0.869± 0.162	0.820± 0.352	0.979± 0.099	0.970± 0.185	0.995± 0.229	1.020± 0.247	0.979± 0.173	0.975± 0.302	0.907± 0.215	1.125± 0.393	0.840± 0.150	0.761± 0.440	0.922± 0.226	0.858± 0.282
	0.151		0.012		0.418		0.802		0.680		0.941		0.003		0.245		0.311	
P5	0.943± 0.245	0.870± 0.313	0.971± 0.209	0.904± 0.399	0.869± 0.162	0.858± 0.330	0.979± 0.099	1.020± 0.202	0.995± 0.229	1.116± 0.358	0.988± 0.186	1.045± 0.323	0.907± 0.215	1.250± 0.255	0.858± 0.153	0.918± 0.497	0.937± 0.216	0.950± 0.346
	0.296		0.342		0.851		0.235		0.087		0.338		0.050		0.423		0.852	

Tabla 18b: Medias y desviación estándar entre el grupo terapia médica (TM) y celular (TC) obtenidas en cada punto de control respecto a la inclusión (valores no indexados al punto de inclusión; escala 0-3) para cada una de las variables del estudio.

	T.Schirmer		Descarga		Hiperemia		Pigmento		Vasos		Edema		Test color.		Punt. Total		Estadío	
	TM	TC	TM	TC	TM	TC												
P0	1.94± 0.12	1.89± 0.25	1.92± 0.11	1.57± 0.22	2.30± 0.10	1.86± 0.20	0.75± 0.15	0,78± 0.24	1.57± 0.12	1.23± 0.26	1.53± 0.10	1.35± 0.18	0.19± 0.07	0.05± 0.22	10.50± 0.54	9.00± 1.18	2.43± 0.09	2.21± 0.18
P1	1.37± 0.15	1.07± 0.30	1.51± 0.10	0.76± 0.19	1.76± 0.12	0.79± 0.18	0.67± 0.13	0.70± 0.21	1.35± 0.10	1.04± 0.21	1.34± 0.08	1.06± 0.19	0.00± 0.00	0.00± 0.00	8.19± 0.56	5.56± 0.96	2.06± 0.09	1.61± 0.15
P2	1.40± 0.14	0.91± 0.30	1.59± 0.10	0.81± 0.23	1.82± 0.11	0.82± 0.19	0.68± 0.14	0.58± 0.20	1.37± 0.09	0.92± 0.19	1.35± 0.09	0.89± 0.14	0.00± 0.00	0.05± 0.22	8.36± 0.55	5.02± 1.05	2.11± 0.09	1.41± 0.17
P3	1.58± 0.13	1.23± 0.32	1.66± 0.10	0.71± 0.23	1.86± 0.11	1.04± 0.19	0.70± 0.14	0.61± 0.22	1.38± 0.09	0.96± 0.22	1.38± 0.09	0.94± 0.17	0.00± 0.00	0.1± 0.30	8.71± 0.53	5.71± 1.16	2.21± 0.08	1.61± 0.17
P4	1.63± 0.14	1.07± 0.31	1.75± 0.10	0.88± 0.19	1.88± 0.11	1.32± 0.30	0.67± 0.14	0.66± 0.21	1.41± 0.09	1.20± 0.23	1.41± 0.09	1.25± 0.15	0.00± 0.00	0.15± 0.36	8.89± 0.53	6.67± 1.16	2.18± 0.09	1.77± 0.21
P5	1.65± 0.13	1.31± 0.29	1.80± 0.10	1.19± 0.20	1.88± 0.11	1.44± 0.29	0.67± 0.14	0.77± 0.28	1.41± 0.09	1.52± 0.28	1.42± 0.09	1.48± 0.20	0.00± 0.00	0.05± 0.22	8.98± 0.53	7.98± 1.35	2.21± 0.08	1.97± 0.19

5.1 Test de Schirmer

En relación al Test de Schirmer, tanto los animales con TC y TM experimentaron una mejoría significativa alcanzando sus mejores valores a los 3 meses de iniciar los tratamientos, para posteriormente seguir una tendencia de empeoramiento. Aunque no hubo diferencias significativas entre ambas terapias a lo largo de los diferentes puntos de control, los animales con terapia celular mostraron una tendencia de mejoría más favorable que con el tratamiento médico. Este beneficio se vio reflejado en todos los puntos de control (Fig.18).

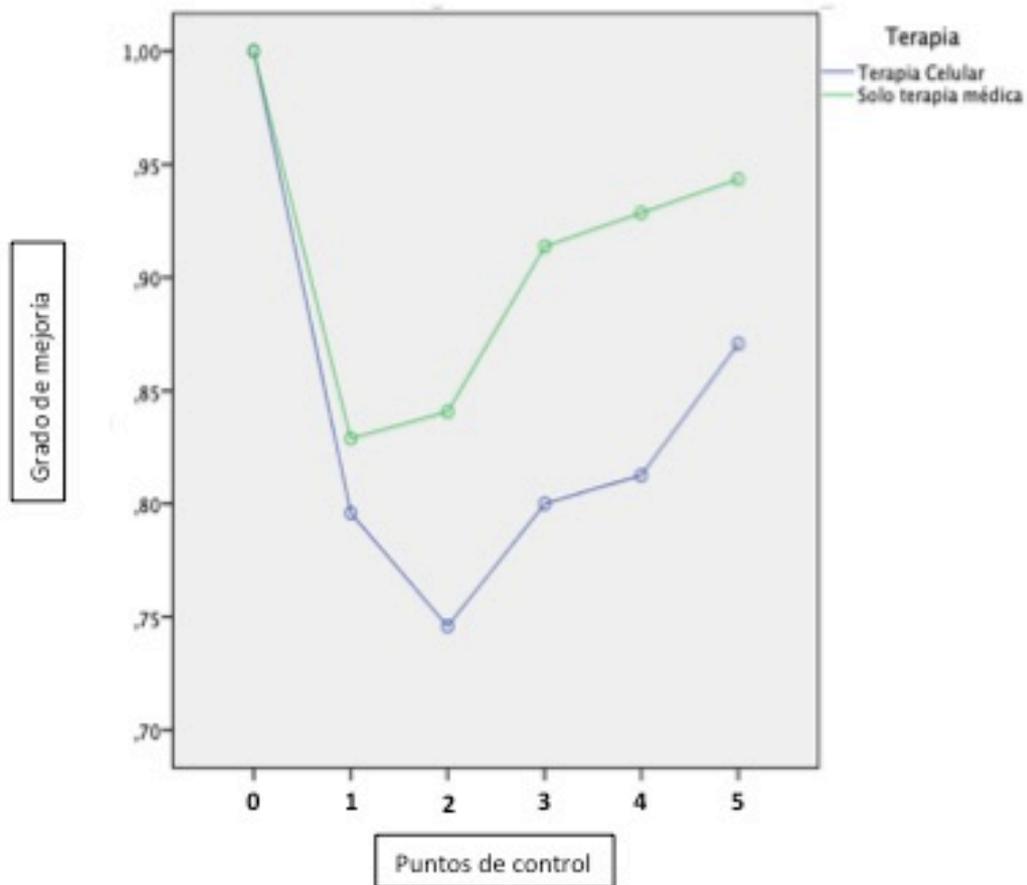


Figura 18: Representación del grado de mejoría en el Test de Schirmer obtenido en los distintos puntos de control (P1-P5) respecto al punto de inclusión (P0) en el grupo Terapia Médica y Celular.

5.2 Descarga ocular

En relación a la descarga ocular, ambos grupos mejoraron de forma significativa en los puntos iniciales, pero sin haber diferencias entre ellos. Aún así, se observó un resultado más favorable en el grupo TC con respecto al TM en estos primeros puntos de control. Las diferencias significativas aparecieron a los 6 y 9 meses del tratamiento, en donde los animales con TC mostraban valores más bajos que los de TM y por lo tanto un grado de mejoría mayor respecto al punto de inclusión (Fig.19).

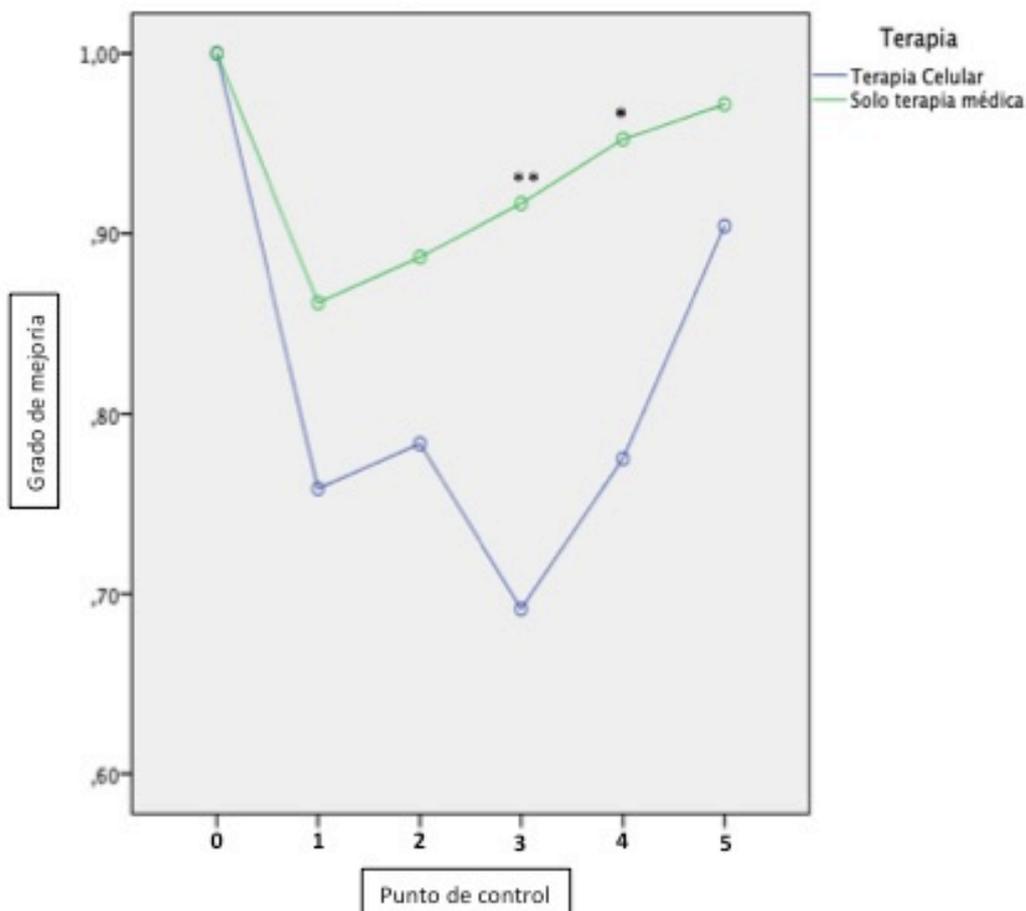


Figura 19: Representación del grado de mejoría en la descarga ocular obtenido en los distintos puntos de control (P1-P5) respecto al punto de inclusión (P0) en el grupo Terapia Médica y Celular. Nivel de significación: *= $p < 0.05$ y **= $p < 0.01$.

5.3 Hiperemia

Con respecto a la hiperemia se observó una mejoría con ambos tratamientos, hallándose diferencias significativas entre ambas terapias desde los 45 días hasta los 6 meses. En este caso los animales con TC reflejaron mejores resultados que los animales con TM. (Fig.20).

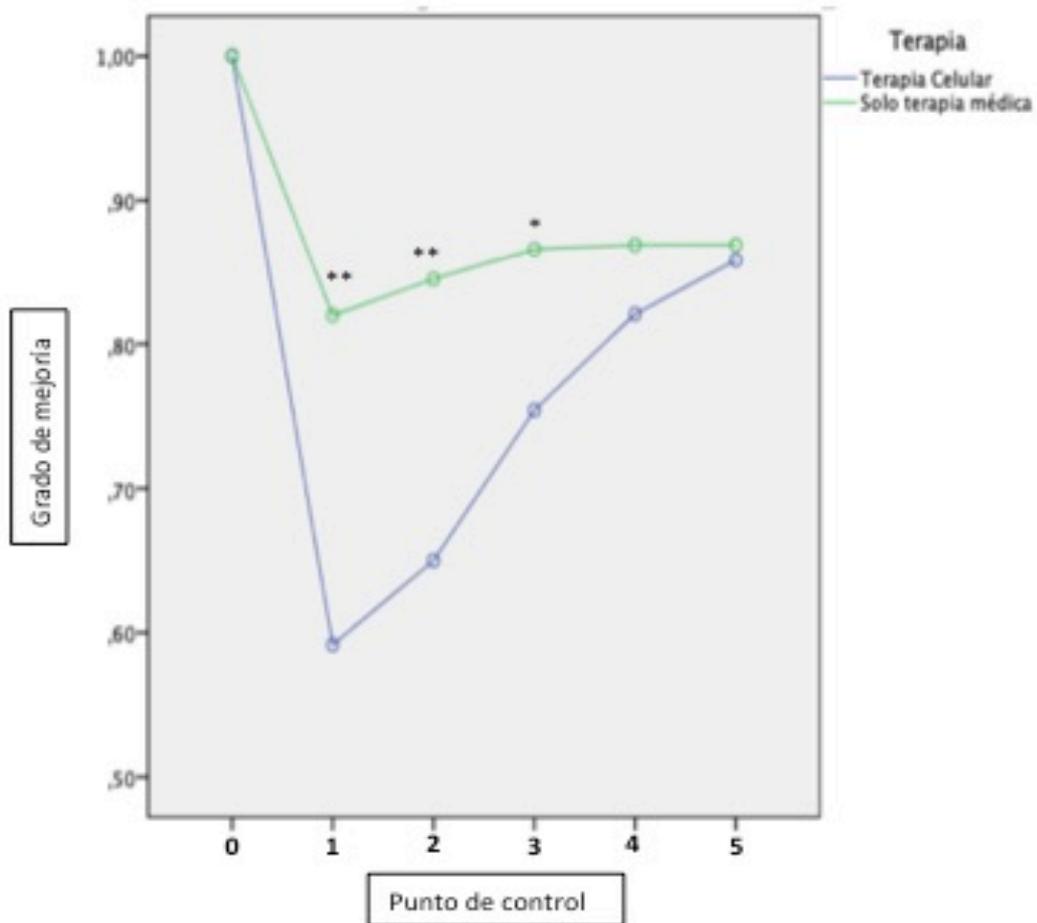
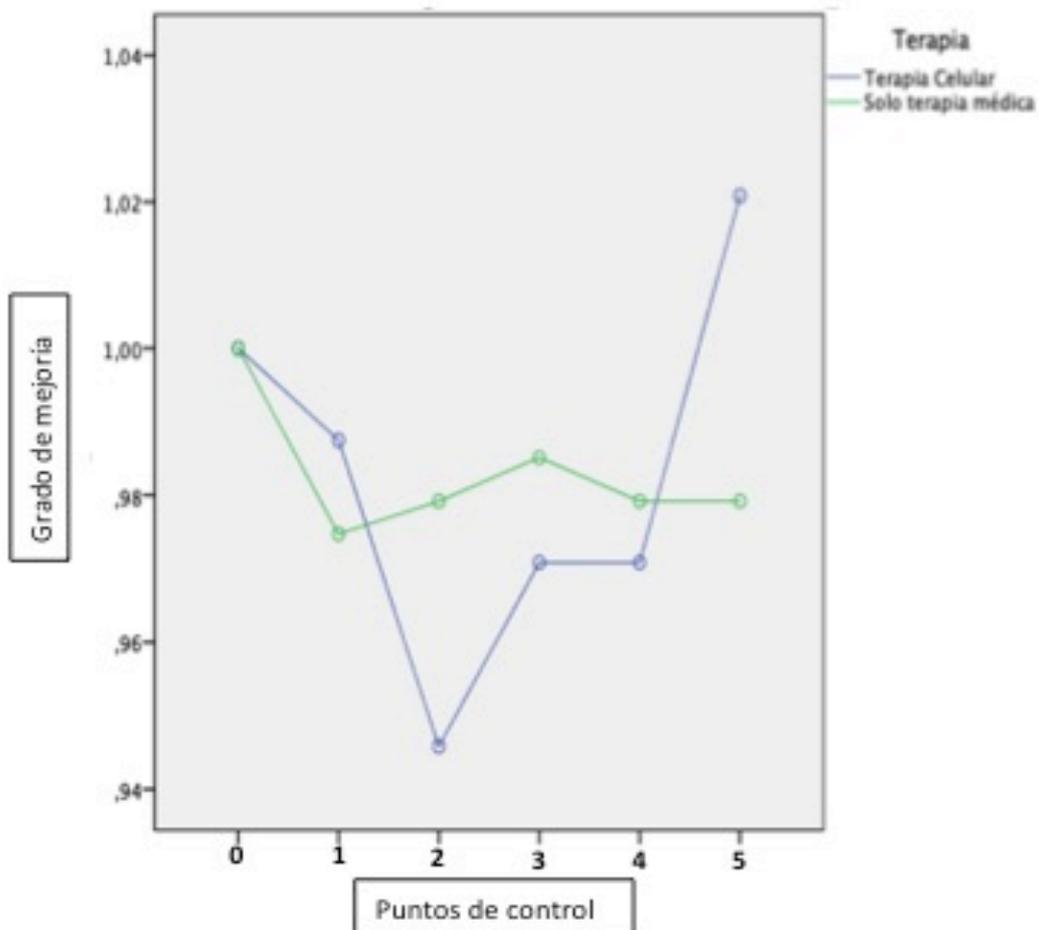


Figura 20: Representación del grado de mejoría en la hiperemia conjuntival obtenido en los distintos puntos de control (P1-P5) respecto al punto de inclusión (P0) en el grupo Terapia Médica y Celular. Nivel de significación: $*=p<0.05$ y $**=p<0.01$.

5.4 Pigmento

Ambos grupos presentaron una tendencia de mejoría con respecto al pigmento, pero no hubo diferencias significativas entre ambas terapias a lo largo de los diferentes puntos de control del estudio (Fig.21). En el grupo TC se observó un beneficio mayor a los 3 meses con respecto a los de TM, pero que a largo plazo se



fue desvaneciendo.

Figura 21: Representación del grado de mejoría en el pigmento corneal obtenido en los distintos puntos de control (P1-P5) respecto al punto de inclusión (P0) en el grupo Terapia Médica y Celular.

5.5 Vascularización

Con respecto a la vascularización se observó una mejoría con ambos tratamientos. Aunque no se hallaron diferencias significativas entre ambas terapias a lo largo de los diferentes puntos de control, sí que en los animales con TC se observó un resultado más favorable a los 3 y 6 meses (Fig.22).

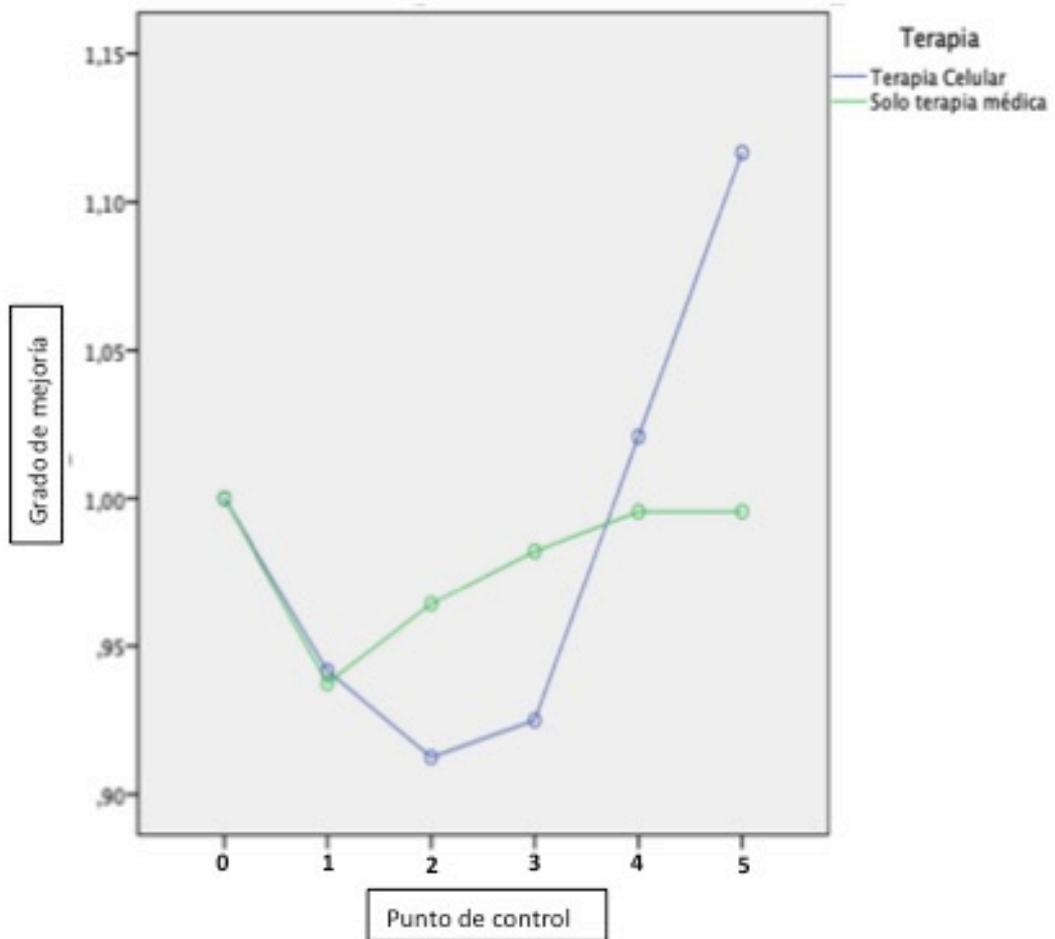


Figura 22: Representación del grado de mejoría en la vascularización corneal obtenido en los distintos puntos de control (P1-P5) respecto al punto de inclusión (P0) en el grupo Terapia Médica y Celular.

5.6 Edema

Con ambos tratamientos se vio una tendencia de mejoría en los puntos iniciales. Aunque no hubo diferencias significativas entre ambas terapias, sí que se observó una tendencia favorable en los animales con TC respecto a los de TM.

Dicho beneficio se hizo significativo a los 6 meses del tratamiento, ya que los animales con TC alcanzaron su mejor resultado mientras que los TM se mantuvieron estables respecto al punto de control 2 (Fig.23).

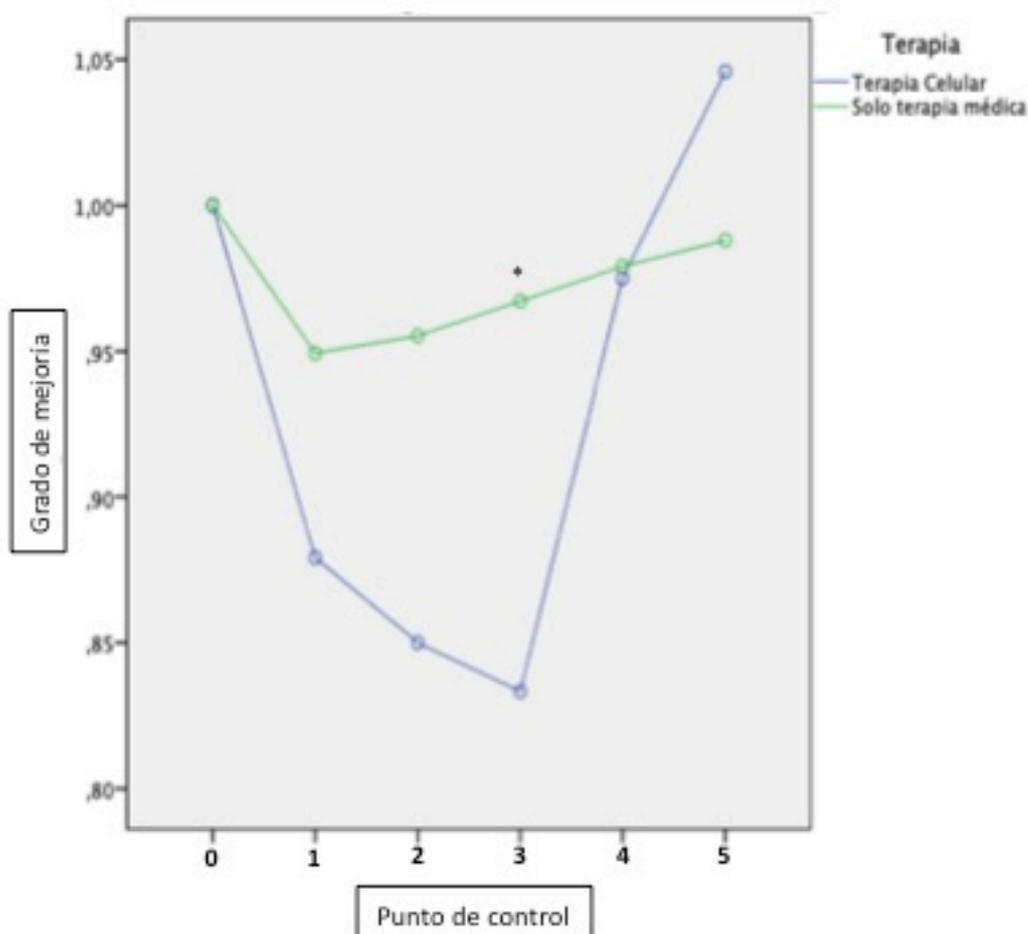


Figura 23: Representación del grado de mejoría en el edema corneal obtenido en los distintos puntos de control (P1-P5) respecto al punto de inclusión (P0) en el grupo Terapia Médica y Celular. Nivel de significación: $*=p<0.05$.

5.7 Test colorimétrico

Con respecto al test colorimétrico se observó una tendencia de mejora hasta los 45 días con ambos tratamientos, encontrándose diferencias entre ambas terapias a los 6 y 9 meses. Los animales con TC sufrieron un empeoramiento respecto a los de TM que se mantuvieron estables a lo largo de los diferentes puntos de control (Fig.24).

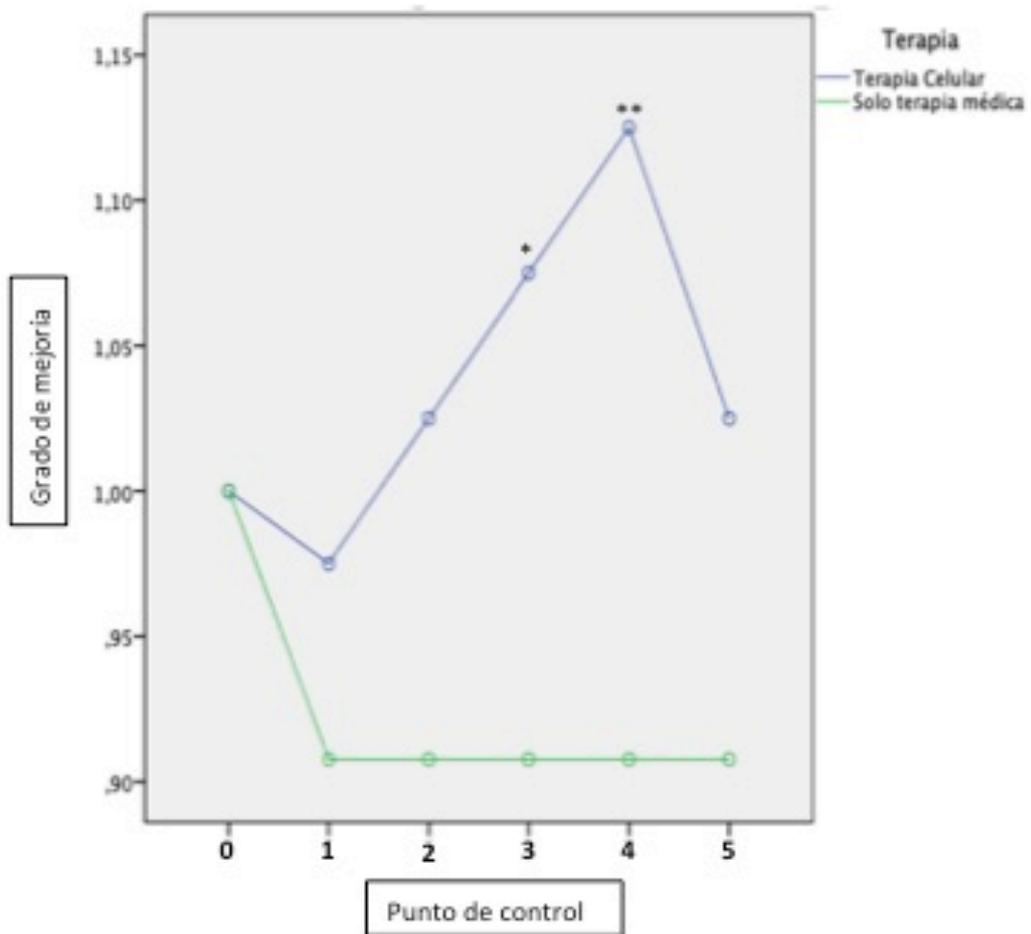


Figura 24: Representación del grado de mejoría en el test colorimétrico obtenido en los distintos puntos de control (P1-P5) respecto al punto de inclusión (P0) en el grupo Terapia Médica y Celular. Nivel de significación: $*=p<0.05$ y $**=p<0.01$.

5.8 Puntuación total

Con ambos tratamientos los animales mejoraron en su puntuación total, pero mientras que los animales con TM alcanzaron su mejor resultado a los 45 días, los animales con TC prolongaron dicho beneficio hasta el punto de control 2. Fue a los 3 meses cuando se observaron diferencias significativas entre ambas terapias y que se continuó hasta los 6 meses

Los resultados también mostraron las diferencias de comportamiento entre ambas terapias, en donde los animales con TM fueron empeorando de forma más progresiva a lo largo del estudio, mientras que los animales del grupo TC, aunque su mejoría fue mayor, también su empeoramiento fue más agudo (Fig.25).

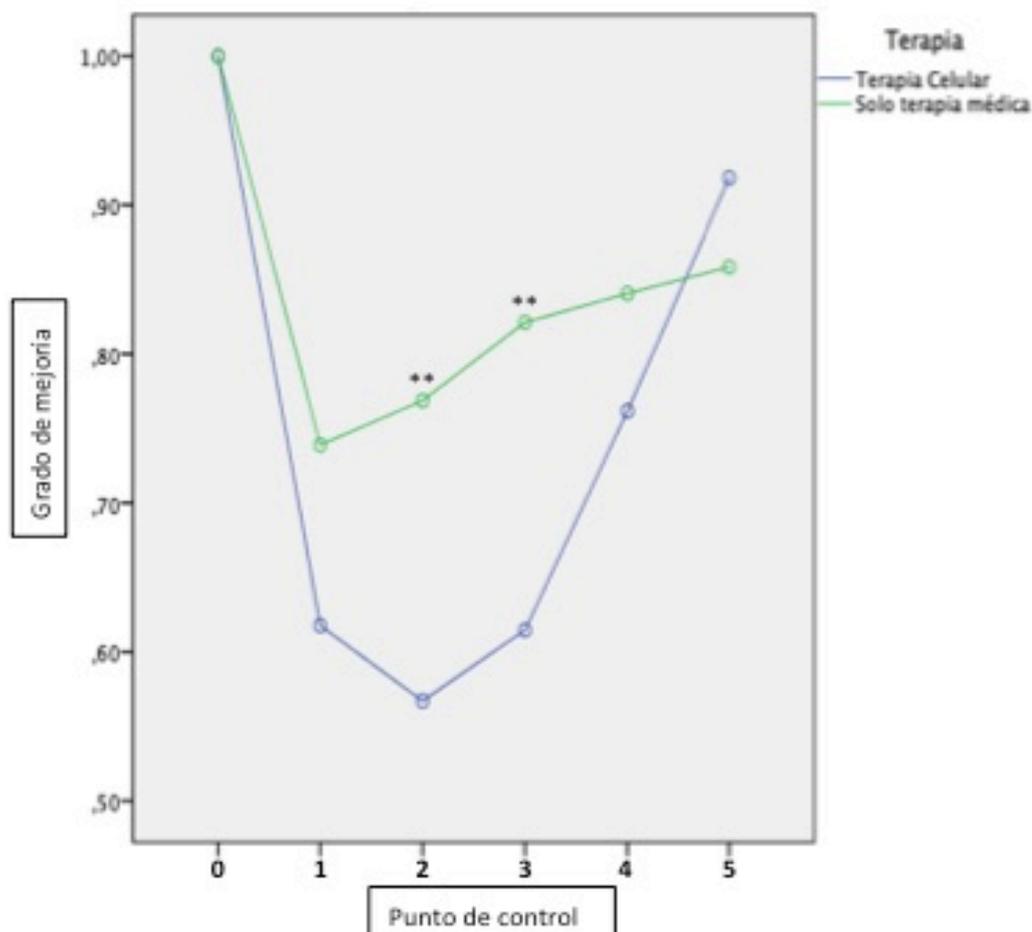


Figura 25: Representación del grado de mejoría en la puntuación total obtenido en los distintos puntos de control (P1-P5) respecto al punto de inclusión (P0) en el grupo Terapia Médica y Celular. Nivel de significación: **= $p < 0.01$.

5.9 Estadio

Con ambos tratamientos los animales redujeron su estadio, apareciendo diferencias significativas en el punto de control 2 y 3. A partir de los 3 meses los animales con TM fueron estabilizándose de forma gradual, mientras que los animales con TC alcanzaron su mejor resultado, y por lo tanto estadios más leves (Fig.26).

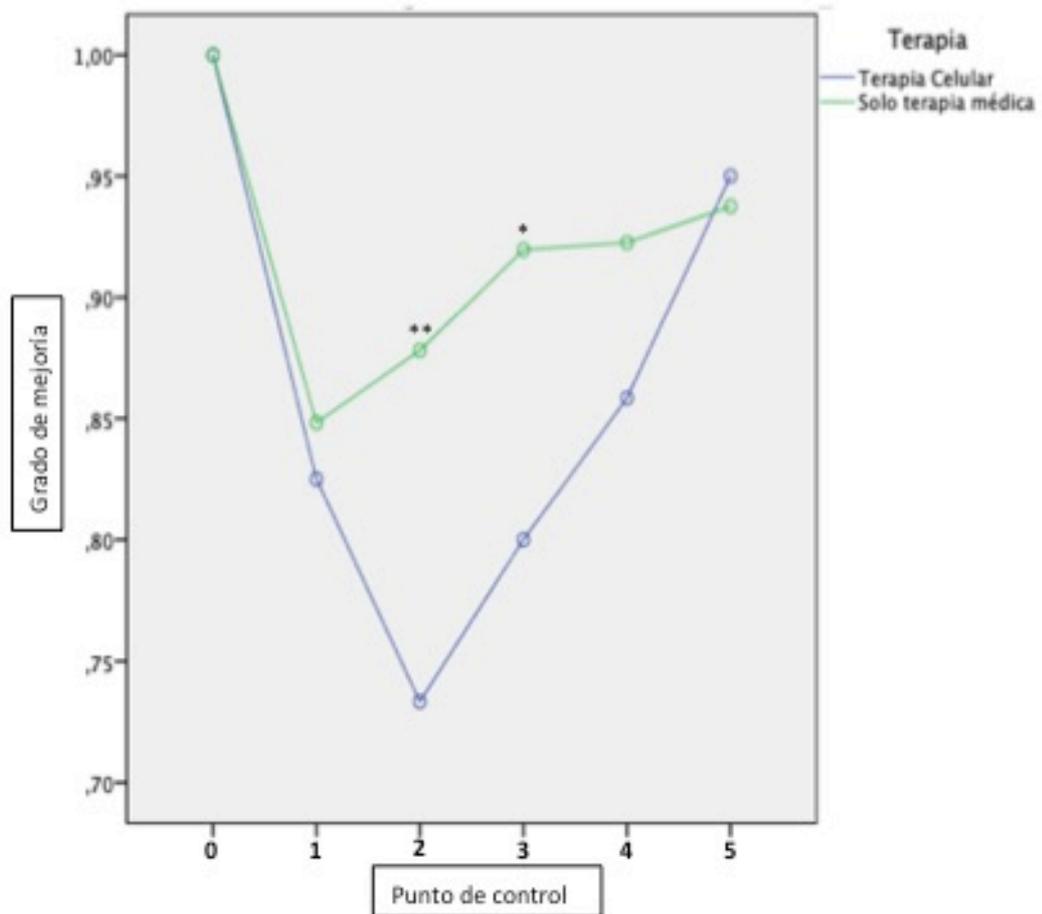


Figura 26: Representación del grado de mejoría en el estadio obtenido en los distintos puntos de control (P1-P5) respecto al punto de inclusión (P0) en el grupo Terapia Médica y Celular. Nivel de significación: $*=p<0.05$ y $**=p<0.01$.

Discusión

1. Validación de la escala clínica para la gradación de pacientes con queratoconjuntivitis seca

En pacientes humanos, la QCS es una enfermedad que afecta a millones de personas a nivel mundial, representando unas las enfermedades más comunes de la superficie ocular¹. Ocurre igual en la especie canina, que ha llegado a representar del 1 al 1.5% de toda la población canina que acudía a los hospitales veterinarios de América del Norte.^{112,115}

El uso de escalas clínicas para la gradación objetiva de los síntomas de una enfermedad impulsa la ayuda al diagnóstico, la toma de decisiones en el tratamiento y la comunicación con otros profesionales. Para la creación de dichas escalas se ha de basar en varios pasos; el primero de ellos la creación de los ítems o variables para luego testar sobre ellos la validez y fiabilidad.²⁰⁴ Aún así en toda creación de escala existen diversas limitaciones que se han de tener en cuenta. Por un lado las características de la muestra y elaboración de los ítems o variables. En estos casos se recomienda que no sean ambiguos o difíciles de contestar por lo que deben de estar claramente definidos, ser simples y que expresen solo una idea sin que influya la percepción.^{204,205} Además deben ser de calidad, por lo que la literatura de donde se obtienen debe ser veraz. Por otro lado dicha calidad también se puede ver influenciada por el número de investigadores en la recolección de datos.^{206,207} Otras de las limitaciones son la pérdida de datos²⁰⁸, la ausencia de un “gold estándar”²⁰⁴ y el mal uso de la metodología que puede conllevar a realizar de forma errónea las pruebas de validez y fiabilidad.²⁰⁴ Una vez establecida la escala, esta puede ser breve, con un número de variables bajo, pero se ha establecido que mientras el Alfa de Cronbach se encuentre entre valores de 0.8 y 0.9, estas se consideran ideales, aunque escalas con un mayor número de ítems se consideran más realistas.²⁰⁹

En medicina humana el grupo *Dry Eye Workshop* consideró en el 2007 incluir el panel de Delphi modificado, como ayuda en la clasificación de la enfermedad de la queratoconjuntivitis seca en base a la severidad de los síntomas y en ausencia de alteraciones palpebrales.^{2,8} En dicho estudio y consenso internacional establecieron cuatro niveles de gravedad según los síntomas, junto con algoritmos para su tratamiento. Dichas opciones terapéuticas consisten en el tratamiento con lágrimas

artificiales y manejo del entorno en los casos más leves, llegando a procesos quirúrgicos junto con ciclosporina y antiinflamatorios orales en los casos más graves.

En medicina veterinaria existen escalas clínicas para diversas enfermedades como en la enfermedad renal crónica¹⁹⁵, Leishmaniasis canina^{196,197}, la enfermedad intestinal crónica canina¹⁹⁸ y enfermedad mitral degenerativa crónica^{199,210}, entre otras. En el caso de la QCS no existe una escala establecida tal y como están descritas en las enfermedades ya nombradas, y los autores de varias publicaciones usan los diferentes signos clínicos asignándoles un valor en función de la gravedad.^{20,21,152,211} Esto les permitió clasificar a los animales según las variables para observar la evolución del tratamiento a lo largo del tiempo, pero no para crear un estadiaje de la enfermedad. En nuestro estudio, para la creación de la escala, se tomo en cuenta el panel de Delphi modificado², los estudios de veterinaria^{20,152} y posteriormente se presentaron los resultados en diversos Congresos Internacionales^{212,213}. En este caso se usó una población control para testar los resultados. Siguiendo la guía del panel de Delphi², se decidió establecer 4 grupos de severidad, al igual que también se ha usado con otras enfermedades en veterinaria^{195,196}, siendo el estadio 1 la más leve y el 4 la severa. Posteriormente se realizaron modificaciones de dicho panel:

- No se realizó meibometría al carecer del equipamiento.
- Síntomas visuales: se cambió por valoración de la cámara anterior, ya que se estableció que si no se podía valorar de forma correcta, el animal presentaba déficit visuales junto con la exploración neuro-oftalmológica
- Solo se tuvo en cuenta la hiperemia conjuntival y no la tinción mediante colorantes de la misma.
- Los signos clínicos corneales se dividieron en edema, vascularización y pigmento, para así valorar el grado de queratitis. Para su localización se dividió a la córnea en superior, inferior, nasal y temporal. Además de central, paracentral y periférica. No se tuvieron en cuenta patrones específicos como la queratopatía pigmentaria en vortex.²¹⁴
- Tiempo de ruptura de la lágrima (TBUT): aunque se realizó en todos los animales, no se incluyeron los datos en este estudio. Se tomó esta decisión al ser una prueba que no se realiza de forma rutinaria en la clínica veterinaria al requerir de una lámpara de hendidura y experiencia para su interpretación.

Una vez establecido el contenido se procedió a la descripción de las variables no numéricas. Para ello se compararon con otros estudios en veterinaria sobre alteración de la superficie ocular en los cuáles se valoraba también dichas variables.^{20,152} En este apartado se incluyó una población control que posteriormente no fue incluida en el estudio (muestreo no probabilístico intencional), ya que permitió extrapolar y por lo tanto generalizar los resultados observados en ésta²¹⁵, y se seleccionaron tres observadores para completar el cuestionario con la escala clínica. Durante el proceso de construcción de una escala, la fiabilidad es la propiedad que designa la constancia y la precisión de los resultados y para ello se realizaron diversos test sobre los resultados de los observadores. El primero fue el contraste de hipótesis, el cuál permitió aceptar que todas las variables se median de la misma forma por los tres observadores, a excepción de la hiperemia, puntuación total y estadio. Aquí se observó discrepancias entre los observadores de mayor experiencia frente al de menos. El test de alfa de Cronbach mostraba una excelente consistencia interna por lo que los enunciados de las variables fueron homogéneos para los tres observadores. Estos dos test nos dan una visión global, por lo que para valorar la armonía de los observadores se procedió a la realización del coeficiente de correlación Kappa e intraclase.^{189,190} En el índice Kappa los observadores con mayor experiencia mostraron una mayor concordancia entre sí, que con el de menor formación, sobre todo en las variables de descarga ocular, hiperemia, vascularización y puntuación total. Esto indica que estas variables descriptivas, sobre todo la hiperemia que tiene una concordancia pobre frente a la moderada de la descarga ocular y vascularización, es más difícil de interpretar o que se requiere de una mayor experiencia para ello. Aún así la correlación intraclase muestra que los observadores tienen una tendencia similar. Es decir que, aunque dos observadores marcan un valor numérico diferente para una variable, ambos valores muestran gravedad. Por ejemplo, en la vascularización un observador marca 2 y el otro 3. Ambos seleccionan que el signo clínico está avanzado, y no hay una disociación de que uno piense que es leve y otro grave.

Esto puede suponer una limitación ya que dependiendo quien evalúe al paciente, la puntuación total y por lo tanto la clasificación de la enfermedad se puede ver alterada, ya que parte de las variables no se clasifican por un resultado numérico (ejemplo Test de Schirmer), sino por una descripción, lo que puede llevar a

diferentes interpretaciones. Estos fenómenos que conllevan a diferencias, pueden dar lugar a que una pequeña diferencia pueda ser clínicamente relevante y otros que requieran de diferencias mayores para tener implicaciones clínicas.²¹⁶

Es por ello que para aquellos veterinarios con menos experiencia sería recomendable para el correcto uso de la escala, que la descripción de los parámetros se asociase también a fotografías ilustrativas de las lesiones oculares para las variables no numéricas, como en el caso de la hiperemia conjuntival y vascularización corneal.

2. Protocolo de tratamiento con células madre

Desde el descubrimiento de las células madre en todos los tejidos animales y su papel en la homeostasis y reparación natural de los mismos, han sido foco de investigación por su potencial terapéutico. En España, este tipo de terapias con células madre son consideradas medicamentos, por lo que para su uso médico tiene que ser autorizado y supervisado por el reglamento (CE) N° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo y el RD 477/2014 (BOE), aunque en medicina veterinaria no existe una legislación específica vigente que las regule.^{22,23,217}

El origen de estas células puede provenir.^{156,159}

- Células Madre Embrionarias (CME): obtenidas del embrión antes de su implantación, de la masa celular interna del blastocisto.
- Células Madre Adultas (CMA): se usa más comúnmente la terminología células madre mesenquimales estromales multipotentes.
- Células Madre Pluripotentes Inducidas (CMPi): son células adultas completamente diferenciadas, pero que tras técnicas genéticas de reprogramación celular se les induce de nuevo su pluripotencialidad.

En este estudio, al igual que en otros estudios en medicina veterinaria en grandes y pequeños animales, las células usadas fueron las CMM. El por qué de su uso más extendido que las otras células es debido a que su aislamiento es más fácil, ya que se pueden obtener a partir de la mayoría de los órganos y tejidos adultos mesodérmicos. Además, presentan una alta capacidad proliferativa y de autorrenovación permitiendo obtener grandes cantidades y por último sus

propiedades regenerativas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras.^{156,157,159,218} También se eligieron este tipo de células porque carecen del MHC-II, por lo que no sirven como células presentadoras de antígenos que promueven la respuesta inmune con la activación de las células linfoides; incluyendo las células T, B, *natural killer* y las células dendríticas.²¹⁹ Necesaria esta característica en el caso de la QCS inmunomediada debido a la infiltración celular en las glándulas causando así una respuesta inflamatoria.^{125,126,156} Las células madre se obtuvieron de la grasa intrabdominal de donantes sanos, en este caso un perro, por lo que fue un trasplante heterólogo o alogénico y fueron cultivadas hasta alcanzar el pase dos. El tejido adiposo es una de las fuentes habituales de extracción debido a su facilidad de acceso y a la abundancia de tejido para obtenerlas. Según estudios por 100 ml de tejido adiposo humano se pueden obtener 1×10^6 células madre, mientras que la especie canina se pueden aislar células estromales adiposas de solo 100 μ l de tejido adiposo.²²⁰

La decisión de aplicarlas en el pase dos es debido a que a medida que se van realizando los pases, las células en cultivo pueden sufrir alteraciones biológicas.^{156,157,221} Estas alteraciones pueden dar lugar a mutaciones y aberraciones cromosómicas, que pueden dar transformaciones malignas.²²² No se sabe con exactitud cuantos pases se pueden realizar antes de adquirir aberraciones, ya que en estudios con células obtenidas de médula ósea se hallaban estables hasta el pase 3, 20 o nunca mostraban alteraciones.^{223,224,225} Aquellas obtenidas de tejido adiposo no presentaron alteraciones en los pases iniciales, del 1 al 5, mientras que del 6 al 14 comenzaron a observarse aberraciones cromosómicas.²²⁶

En medicina veterinaria se han usado las procedentes de grasa, médula ósea y embrionarias^{174,227}, pero a nivel ocular solamente se han aplicado aquellas extraídas de la grasa; obtenidas del glúteo^{20,186}, ovárica²¹ y subcutánea.^{184,228}

La técnica para su aislamiento *in vitro* ha ido modificándose con el tiempo, siendo Rodbell en 1964 el primero en publicarla. Para ello usó grasa del epidídimo de la rata, para luego posteriormente realizar la digestión a 37°C con Colagenasa de tipo I y separando los componentes mediante centrifugación.²²⁹ Tras ella los adipocitos maduros se localizaban flotando debido a su alto contenido lipídico, mientras que el pellet contenía los componentes estromales vasculares con las supuestas células progenitoras de adipocitos y la líneas hematopoyéticas.

Posteriormente esta técnica se fue modificando con el uso de factores inductivos tales como la dexametasona, insulina y biotina para la diferenciación de las células precursoras de los adipocitos en humanos.²³⁰ En este estudio se siguieron dichos procedimientos, al igual que se realizó el lavado mediante PBS y se cultivó mediante antibióticos, tal y como esta descrito, sometiendo dichos cultivos a una temperatura de 37°C, una concentración de CO₂ entre el 5% y 8,5% y alcanzando una confluencia del 70% al 80%.^{231,232}

Una vez alcanzado el pase de cultivo que se desea las células pueden guardarse congeladas en nitrógeno líquido, ya que se ha demostrado que no inducen la muerte celular.²³¹

No existe una dosis establecida de terapia celular, sino que se trabaja con dosis empíricas en base a los estudios publicados. En el caso de medicina veterinaria las dosis varían en función de los diferentes estudios. Dosis de dos millones de células por kilogramo de peso del animal se han aplicado en infusión intravenosa para el tratamiento de rotura de ligamento cruzado¹⁷⁴, enfermedad inflamatoria intestinal en el perro¹⁸⁰ y enfermedad renal crónica en el gato.¹⁸¹ Para zonas articulares *in situ* se han administrado cantidades totales de cinco millones¹⁷⁴, llegando hasta las cantidades más altas de diez millones en cardiomiopatía dilatada en el perro.¹⁷⁸

En los estudios centrados en la superficie ocular se han usado dosis de dos millones en la queratitis eosinofílica del gato¹⁸⁴ y en el caso de la QCS canina, de un millón tanto en la glándula lacrimal orbital y de la membrana nictitante²¹. En el caso de Villatoro y colabores²⁰ se usaron cinco millones en la orbital y tres millones en la de membrana nictitante. En nuestro caso se decidió por usar 10 y 5 millones sin observar respuesta inmune no deseada; solamente el día de la aplicación una leve inflamación y sangrado que remitía a las 24 horas.

La vía de aplicación de las células madre a nivel ocular incluye estudios con administración tópica²³³, intravítrea²³⁴ y subretiniana²³⁵ en ratas y la periocular^{20,21,186} y tópica²³⁶ en perros. En este caso se usó la vía periocular siguiendo las indicaciones de Park y colaboradores.²⁸

La experiencia recabada durante el proceso de inoculación de la terapia celular puso de manifiesto que fue un procedimiento simple que solo requirió de una

sedación profunda y mantenimiento mediante mascarilla con isofluorano. En los primeros pacientes del estudio, el tiempo requerido para la administración de la terapia fue mayor, debido a la localización del punto de inyección. Asimismo este también fue mayor al aplicar el tratamiento en la glándula orbital que en la de la membrana nictitante, ya que esta última se localiza con mayor facilidad en la zona ventral del cartílago.

3 Estudio terapéutico: resultados generales

La incidencia de razas que sufren QCS varía no solo con la localización geográfica, sino también por el sexo y la edad. Los estudios publicados en EEUU muestran una mayor prevalencia en Lhasa Apso; con un 70% más de riesgo que el resto de la población. Le siguen el Bulldog Inglés y West Highland White Terrier (WHWT) con un riesgo alto y moderado en el Dachshund, American Cocker Spaniel, Pequinés, Yorkshire Terrier, Schnauzer Miniatura y Boston Terrier.²³⁷ A medida que han ido pasando los años se han ido añadiendo más razas como es el caso del Cavalier King Charles Spaniel, Bloodhound, Shih Tzu, Pug y Samoyedo.²³⁸ En Europa, estudios en Reino Unido mostraron una mayor prevalencia en WHWT, CKCS, Cocker Inglés, English Springer Spaniel, Shih Tzu.^{141,239}

En este estudio las razas más afectadas fueron Yorkshire Terrier con un 21,1%, el Shih Tzu (15,8%), Cocker Spaniel (10,5%) y Bulldog Francés e Inglés (7,9%), por lo que se corresponde con las razas descritas con mayor riesgo de padecer dicha enfermedad. También aparecen, aunque en un porcentaje mucho menor WHWT, CKCS y Schnauzer. Esta variación de las razas depende del país donde se realiza el estudio, ya que por ejemplo el porcentaje de Yorkshire Terrier atendidos es mucho mayor que la de CKCS, ya que esta última es una raza muy popular en Reino Unido y con alta prevalencia, cosa que no ocurre en la localización geográfica donde se ha realizado este estudio.

En el día de inclusión, en el grupo terapia médica, se observó que en los animales braquicefálicos el edema y la vascularización era significativamente mayor que los meso/dolicocefálicos. La aparición de estos signos clínicos en mayor medida en esta conformación craneal puede ser debido a que presentan una mayor

exoftalmia, lagofthalmía y menor sensibilidad corneal, por lo que la córnea esta más expuesta.^{240,241,242}

En el caso de los meso/dolicocefálicos de este estudio se observaron diferencias significativas con respecto a los braquicefálicos en la descarga ocular y pigmento. La migración de melanocitos es común en enfermedades de la superficie ocular como QCS, queratitis por exposición crónica y queratitis pigmentarias, lo que conlleva que en niveles avanzados los animales tengan déficit visuales importantes, llegando a cubrir completamente toda la superficie de la córnea.²¹⁴ La aparición de melanosis corneal según la conformación varía en función de la enfermedad, apareciendo la queratopatía pigmentaria más en braquicefálicos²⁴³ y la queratitis crónica superficial en dolicocefálicos.²⁴⁴ En el caso de la queratoconjuntivitis seca hay una gran variabilidad de signos y de razas afectadas, por lo que la presencia de mayor melanosis en meso/dolicefálicos en la población con terapia médica de este estudio puede deberse a que presentasen una esclera o limbo más pigmentados o por un hallazgo aleatorio de dicho resultado en la muestra. En el caso de la descarga ocular, la cual se acumuló más en animales meso/dolicocefálicos en este estudio, mientras que en publicaciones anteriores se ha descrito una mayor aparición de detritus en los braquicefálicos como es el caso del Pequinés.²⁴⁵

En el día de inclusión el 5,35% de la población del grupo terapia médica se encontraba en el estadio leve (I), el 48,21% en moderado (II), el 42,85% en grave (III) y el 3,57% en severo (IV). En el caso del grupo terapia celular el 25% se encontraba en el estadio I, 40% en II y el 35% III. Con estos resultados la mayor parte de la población se encontraba en el rango de presentar signos clínicos evidentes, ya que en muchas ocasiones la QCS se diagnostica mal y se confunde con una conjuntivitis.⁹ En la población de este estudio, el porcentaje de animales del grupo terapia médica que acudieron con una sintomatología leve fue muy inferior comparado con los estadios moderado y grave. En el caso del grupo terapia celular, el porcentaje que acudió con los primeros síntomas de descarga ocular e hiperemia fue más uniforme con respecto a los estadios moderado y grave.

Con respecto al sexo, se pensó que la QCS afectaba más a las hembras que a los machos, aunque en otros estudios no se ha encontrado diferencias entre ambos sexos, al igual que ocurre con la población de ambos grupos estudiada aquí. Esta referencia a una mayor afección en hembras se atribuye a que en humana el síndrome

de Sjögren ocurre más en mujeres post menopáusicas, debido a la ausencia de hormonas sexuales de testosterona y andrógenos.^{115,141,237,246} Esta enfermedad autoinmune viene acompañada de QCS, xerostomía y la afección de otros tejidos conectivos generando artritis reumatoide.

La edad de aparición de la QCS esta relacionada, tanto en medicina humana como veterinaria, con los cambios inflamatorios crónicos de las glándulas asociado con la edad.²⁴⁷ En el estudio de Kern y colaboradores observaron que la edad de aparición era a los 7 años²⁴⁸, aunque otros establecieron una distribución bifásica de uno a cuatro y de siete a nueve años.²⁴⁹ Estudios mas recientes en perros¹⁴¹ han encontrado diferencias en la edad en función de diferentes razas, como en el caso de los Shih-Tzu y CKCS cuyos signos aparecían en dos picos. Uno en animales más jóvenes (< 2 años) y otro más tardío que transcurre de los seis a los ocho años en CKCS y de los cuatro a los seis en Shih Tzu. En otras razas como el WHWT se encontró un solo pico de los dos a los 4 años. En este estudio la edad media de la población total fue de $8,97 \pm 2,85$ años, entrando en el rango de lo descrito en otros artículos. Con respecto a las razas, el CKCS se encontraba en el rango inferior a los dos años, los Shih Tzu con una edad media de 9,16 años y los WHWT con 10,5 años superando la edad descrita de lo publicado. Esto puede ser debido a factores de la localización geográfica o que los dueños pueden tardar más en llevar a su animal al especialista. En el caso de los Yorkshire Terriers también fue importante la edad, para descartar que no fuese un proceso de hipoplasia/aplasia de la glándula lacrimal que aparece en animales jóvenes.¹¹⁶

4. Análisis de la eficacia de la terapia médica

La primera vez que se aisló la ciclosporina fue en los años 70 como producto del hongo *Tolypocladium inflatum*. Su utilización oral en medicina humana comenzó para prevenir el rechazo de trasplantes y tratamiento de enfermedades autoinmunes, hasta que llegó su uso tópico para evitar esos mismos rechazos a nivel corneal y para el tratamiento de la úlcera de Mooren, queratoconjuntivitis vernal, conjuntivitis leñosa y QCS en pacientes con el síndrome de Sjögren.^{250,251,252,253} En medicina veterinaria, el primero que introdujo el uso de la ciclosporina tópica en el perro para estudiar sus efectos lacrimógenos fue el Dr Kaswan y colaboradores al comentarle un

conocido que estaba siendo tratado con ciclosporina debido a un trasplante de riñón, y que estaba sufriendo un aumento de la producción lacrimal debido a ello.²⁵⁴

La vía de actuación de la ciclosporina reside en la inhibición de la proliferación de las células T y por lo tanto de la interleukina 2 y 3 (IL-2, IL-3), IFN- γ y TNF- α . Para ello se une a la proteína ciclofilina, de la familia de las inmunofilinas, formando así un complejo ciclosporina-ciclofilina que inhibe la calcineurina.^{30,255} Asimismo no tiene lugar la desfosfoliración de los factores nucleares de las células T activadas, llevado a cabo por la calcineurina, por lo que no se promueve la transcripción de la interleukina 2.²⁵⁶ Su penetración en la glándula lacrimal y reservorio en la córnea se ve favorecida por la naturaleza lipofílica de la molécula, que facilita su distribución y almacenamiento, siendo más compleja su penetración intraocular.²⁵⁷

La concentración del producto varía desde 0,2% (comercial) hasta el 1% y 2% en solución oleosa (fórmula magistral), comenzando los estudios con la del 2% para ir luego disminuyendo. En este estudio se usó la concentración del 2% en solución oleosa y se aplicó tres veces al día en ambos ojos. Los resultados en el estudio a lo largo de un año mostraron que los valores del *Test de Schirmer* mejoraban de forma significativa en los tres primeros meses en el 100% de los animales, para luego ir empeorando de forma gradual hasta que llegan a estabilizarse, pero sin alcanzar los valores iniciales de antes de empezar con la terapia médica. En estudios anteriores donde se usó la misma concentración, la mejoría del Test del Schirmer fue significativa en el 59% y 93,6% de los casos^{254,258} y en el estudio de Hendrix¹⁵² la diferencia significativa apareció a las doce semanas de comenzar el tratamiento con ciclosporina. El uso de concentraciones menores como del 1% cada 12 horas también ha dado una mejoría en el 86,4% de los pacientes¹³ y la de 0.75% cada 8 horas incrementó de forma significativa los valores de STT I a los dos meses del tratamiento.²⁵⁹ Actualmente se dispone de un producto comercial al 0,2%, el cual según estudios presenta la misma capacidad lacrimógena que al 2%, pero sin apenas efectos adversos de irritación de la superficie corneal.^{257,260}

En la *descarga ocular e hiperemia* se observó una mejoría significativa en los primeros 45 días. Mientras que la hiperemia conjuntival se mantuvo estable a lo largo de todo el estudio, la descarga ocular empezó a empeorar de forma progresiva hasta volver a valores iniciales a los 9 meses. En otros estudios no se observó

mejoría a corto plazo¹⁵² o hubo una reducción de la descarga ocular en el primer mes de tratamiento, alcanzado los mejores resultados a los dos meses que es cuando se finalizó el estudio; por lo que no hay seguimiento de la evolución de dicho signo clínico a más a largo plazo.²⁵⁹

La pérdida de claridad de la córnea es debido a la hiperplasia epitelial con queratinización e infiltración estromal celular, además de la aparición de vascularización corneal y depósito de pigmento.¹³ En diferentes estudios se ha demostrado que el uso de la ciclosporina reduce la vascularización corneal^{13,259}, pigmento y el edema¹³, mientras que en otros no se observó una reducción significativa de dichos parámetros.^{152,258} En este estudio no hubo mejoría significativa a nivel del *pigmento*, y en el caso de la *vascularización y el edema corneal* hubo una mejoría significativa a los 45 días, pero sin llegar a la desaparición completa de los vasos y alcanzar una transparencia completa de la superficie corneal. El poco efecto sobre el pigmento puede ser debido a que son animales que se encontrasen en un estadio más avanzado, por lo que el grado de melanosis se mantiene invariable a lo largo del tratamiento, o que en el caso de que algún paciente sufriese alguna leve mejoría, no afectó al global de la población.

Otro fármaco de elección para el tratamiento de la QCS es el tacrólimus. Aislado de *Streptomyces tsukubaensis*, actúa también sobre el ciclo de activación de las células T, más concretamente previene la transcripción genética de las linfoquinas IL-2, IL-3, IL-4, IFN- γ y TNF- α . Su administración tópica ha representado una alternativa a aquellos perros que reciben ciclosporina A, y cuyo efecto deja de ser el deseado para el tratamiento de la queratoconjuntivitis seca.^{14,152} La razón de esta respuesta no está del todo esclarecida, pero puede deberse a diferencias en la biodisponibilidad del medicamento o por su mecanismo de acción, ya que se ha demostrado que *in vitro* tiene una potencia de 10 a 100 veces superior que la ciclosporina A.^{261,262} En este estudio solo se usó ciclosporina A, para que todos los pacientes recibieran un tratamiento homogéneo, y así poder valorar la influencia de la terapia celular. Tampoco se procedió al cambio de tratamiento en el transcurso del año en el caso de que los animales no respondieran bien a la terapia o si esta disminuía su efectividad.

5. Análisis de la eficacia de la terapia celular

El uso de las células madre es una terapia innovadora con una amplia posibilidad en el tratamiento de diversas enfermedades en medicina veterinaria.

A nivel de QCS encontramos algunos estudios^{20,21,236} con resultados positivos, aunque sin un grupo control con terapia médica para comparar la evolución en el tiempo, que discutiremos en el próximo apartado. En dos de esos estudios la aplicación de la terapia celular fue directamente inyectada a nivel de ambas glándulas^{20,21}, mientras que en el estudio más reciente la ruta de administración fue tópica.²³⁶

En dichos estudios se realizaron controles a los 3, 6 y 9 meses²⁰, a los 14, 28 días y 6 y 12 meses²¹ y por último a los 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días.²³⁶ En este estudio, al igual que en los otros, se realizó un control en un periodo corto de tiempo de 45 días y 3 meses, para luego ampliarlo y llegar hasta el año.

En el *Test de Schirmer* hubo una mejoría significativa a los 45 días, observándose los mejores valores a los 3 meses, para luego mantenerse estable durante 3 meses más e ir empeorando de forma progresiva hasta el año, pero sin volver a los resultados del día inicial. En el estudio de Villatoro y colaboradores²⁰ se observó una mejoría significativa a los 3 meses manteniéndose estable hasta los 9 meses, sin volver a los valores iniciales. En el caso de Bittencourt y colaboradores²¹ se dividieron a los pacientes en dos grupos; por un lado los leves y moderados y por otro lado los severos. En ambos grupos hubo una mejoría significativa a los 28 días, 6 y 12 meses, manteniéndose de forma estable sin volver a los valores iniciales. En el último estudio publicado²³⁶ la máxima mejoría se observó a los 60 días, para luego sufrir un leve empeoramiento a los 120 días, pero sin llegar a los valores iniciales al final del estudio.

En el día cero la población de este estudio presentó un valor medio de Test de Schirmer de $7,85 \pm 5,95$ mm/min el cual fue ligeramente superior a aquellos obtenidos en otros estudios que fueron de $4,96 \pm 2,97$ mm/min²⁰ y de $2,44 \pm 0,38$ mm/min.²¹ Este último pertenecía al grupo que se clasificó como severo, mientras que aquellos pacientes que se encontraban en el leve-moderado presentaron unos valores de $10,33 \pm 0,79$ mm/min.²¹ Por lo tanto la población de este estudio no presentó valores medios tan disminuidos de Test de Schirmer (< 5 mm/min) que

otros publicados.^{20,21} Tras la infusión celular los mejores resultados se obtuvieron a los 3 meses con valores de $12,55 \pm 6,70$ mm/min, siendo ligeramente superiores a los obtenidos en el mismo punto de control de Villatoro y colaboradores²⁰ que fue de $11,16 \pm 4,57$ mm/min. A los doce meses de la infusión celular la población de este estudio sufrió un empeoramiento acabando con unos valores medios de $9,50 \pm 6,32$ mm/min, sin llegar a los registrados en el día inicial. No ocurrió lo mismo en los controles finales de los estudios ya mencionados, ya que lo que se observó en el estudio de Villatoro y colaboradores²⁰ es que la mejoría experimentada por los animales se mantenía estable a lo largo de los meses hasta alcanzar el final del estudio, 9 meses, con valores medios de $12,66 \pm 5,69$ mm/min. Al igual ocurrió en el grupo denominado severo del estudio de Bittencourt y colaboradores²¹, que completaron el año con valores medios de $11,50 \pm 1,55$ mm/min; pero no con el grupo leve-moderado, el cual tuvo un empeoramiento de los 6 a los 12 meses con una reducción de los valores medios del Test de Schirmer de $22,11 \pm 1,58$ mm/min a $20,44 \pm 1,58$ mm/min.

En el punto de inicio las poblaciones de los diferentes estudios presentaban diferentes valores medios de Test de Schirmer que variaban del moderado al severo. Al aplicar las células, se observó una mejoría en todos los casos, siguiendo una tendencia en la que en los primeros meses los animales mejoraban de forma acelerada, para luego ser esta más progresiva o sufrir un retroceso. También se observó que aquellos animales con valores situados en el leve-moderado alcanzaban valores fisiológicos normales con dosis bajas de células madre, mientras que los que se encontraban en valores severos alcanzaban valores fisiológicos por debajo de 15 mm/min. Lo mismo ocurrió en el estudio de Villatoro y colaboradores²⁰, que partieron de valores medios por debajo de 5 mm/min y que con dosis superiores se incrementaba de forma rápida durante los primeros meses, para luego adquirir unos resultados finales similares al grupo severo de Bittencourt y colaboradores²¹. En este estudio el uso de una dosis superior de células madre, 5 y 10×10^6 , dió lugar a un incremento del 28% a los tres meses alcanzando valores por debajo de 15 mm/min, pero que luego se redujeron un 17% al final del año.

La diferencia de valores entre los estudios puede deberse a la gran variabilidad de las células madre al aplicarse *in vivo*, su preparación, farmacodinamia y técnicas de aplicación.

En la *descarga ocular* se observó una mejoría significativa a partir de los 45 días, observándose los mejores valores a los 6 meses con una reducción de la descarga del 34%, a partir del cual comenzó el repunte hasta el último punto de control, en el cual no hubo diferencias con el inicio. Comparándolo con otros estudios²⁰, el punto de inicio de ambas poblaciones presenta unas medias similares de 1,62 y 1,57 respectivamente. En dicho estudio se usó la misma clasificación de la variable en leve, moderado o grave, pero no comentaron la descripción específica de ella.²⁰ Se observó una mejoría significativa a los 3 meses, alcanzando su mejor valor a los 6 meses con una media de 0,37 frente a la de este estudio de 0,71, y se mantuvo estable hasta su último punto de revisión a los 9 meses. Estos resultados también se asemejan con los publicados en estudios más recientes en donde a los 28 días tras la infusión de la terapia celular se vio una mejoría significativa en todos los pacientes que se prolongó hasta el año, observándose que la población se concentraba en los grados 0 (ausente) y 1 (leve).²¹

Asimismo, se ha observado también la recaída de este signo clínico en el estudio de Sgrignoli y colaboradores²³⁶, en donde el 31,8% de los pacientes lo manifestaron a los 180 días post tratamiento.

La *hiperemia* al igual que en los anteriores signos clínicos mostró una mejoría significativa a los 45 días post inoculación con una reducción del 31% y manteniéndose estable hasta los 6 meses, para luego ir empeorando hasta no haber diferencias significativas con el punto inicial. El valor de la media en el inicio de este estudio fue de 1,86, frente a los 1,5 de otro estudio publicado,²⁰ por lo que esta población presentaba más grado de hiperemia. Los mejores resultados se alcanzaron a los 45 días con una media de 0,78, mientras que en el otro estudio²⁰ fue a los 9 meses con 0,33. Durante ese periodo de tiempo los pacientes ya habían recaído del signo clínico, presentando una media de 1,32 al final del estudio y un empeoramiento del 25% respecto a los 45 días. Al igual que con la descarga ocular, también se ha descrito empeoramiento a largo plazo de la hiperemia.²³⁶

La *vascularización* presentó una tendencia de mejora a los 45 días, pero no fue hasta los 3 meses cuando se encontraron diferencias significativas, para luego seguir una tendencia de empeoramiento hasta los 9 meses, alcanzando peores valores al año en comparación con el día de inclusión. El estudio de este signo clínico no se ha realizado por todos los autores, pero en los que sí, al igual que ocurrió en esta

población, se observó una mejoría en las primeras revisiones, para luego a largo plazo no haberla con los valores iniciales.²¹

En el *edema* se observaron cambios significativos a medio -largo plazo, 3 y 6 meses con una reducción del 16%, al igual que ocurre en otros estudios²⁰ donde los cambios a nivel de la córnea se observaron a partir de los 6 meses. Por el contrario, en otros se observó dicha mejoría a corto plazo, para luego no ser significativo al final del año de tratamiento.²¹ En este estudio también se observó un empeoramiento del edema a partir del sexto mes tras la inoculación de la terapia celular.

Cuando los estudios hablan de opacidad corneal, no se hace distinción entre el edema y el pigmento, y solamente en el estudio de Sgrignoli y colaboradores²³⁶ es donde se observó una reducción del pigmento del 52,3% al 36,3% a los 180 días post aplicación de la terapia celular. En nuestro estudio se observó una leve mejoría a los 3 meses con una reducción del 7%.

Los resultados mostraron que al igual que en otros estudios, la mejoría clínica es significativa en un periodo corto de tiempo (45 días), y que se va acentuando hasta el tercer y sexto mes alcanzando los mejores resultados y manteniéndose estable. Esta reducción de los signos clínicos fue de un 44% a los 3 meses y de un 39% a los 6 meses respecto al día de inclusión. A partir de este punto se inició un empeoramiento, cosa que no ocurrió en el estudio de Villatoro²⁰ y Bittencourt²¹, pero si en el estudio más reciente en donde el 31,8% de los animales tratados tuvieron recaída y los cuales volvieron al tratamiento convencional para QCS.²³⁶ Este empeoramiento de los signos clínicos pudo ser debido a diversos motivos. Por un lado la ruta de aplicación, ya que requiere de una curva de aprendizaje para la localización y administración de la terapia. Otra diferencia fue el volumen a nivel de las glándulas, además de la influencia de factores como las técnicas de preparación y conservación, junto con la variabilidad de su efecto *in vivo*. También puede ser debido a la reactivación del daño inmunomediado en las glándulas o conjuntiva, como se ha demostrado en medicina humana con pacientes con el Síndrome de Sjögren en sus glándulas salivares y en el epitelio conjuntival de pacientes con QCS.^{263,264,265}

Con estos resultados obtenidos el uso de la terapia con células madre mejora los signos clínicos de la enfermedad de forma significativa en animales crónicos,

permitiendo usar un tratamiento con gotas no tan intensivo. Considerando la tendencia general detectada, probablemente sería oportuno realizar futuros estudios que considerasen una segunda administración a los 6 meses, lo que podría prolongar el periodo de mejoría de manera significativa.

6. Análisis comparativo de la eficacia de la terapia celular vs médica

En este apartado se indexó con el punto de inicio para que así todas las variables que se iban a comparar partieran de un mismo valor inicial, valorándose la elevación o reducción respecto a ese valor como empeoramiento o mejoría. Esto permitió situar a los animales con terapia médica y celular desde el mismo punto inicial y así hacer comparables ambos tratamientos. En los otros estudios consultados^{20,21} sobre el uso de la terapia celular en la QCS no se ha usado un grupo control con terapia médica.

Con ambos tratamientos se observó una mejoría en todos los signos clínicos, para luego mantenerse a lo largo de los meses, hasta que al final del estudio empeoraban y se asemejaban a los valores iniciales. En el caso de la terapia médica el empeoramiento fue de forma más gradual, mientras que con la terapia celular se mantuvieron estables hasta los seis meses, para luego presentar una recidiva más aguda. Esta agudización en la terapia celular, a parte de los factores comentados anteriormente, puede ser debida a la baja pauta de inmunomoduladores en estos pacientes, con lo que al disminuir el efecto de la terapia celular, esta no fue suplida con un aumento de las dosis de los colirios.

Los valores de las variables con el tratamiento celular mostraron una mayor tendencia de mejoría que con la terapia médica, siendo significativas en la descarga ocular, hiperemia, edema, puntuación total y estadio.

Resultados similares se han observado en otros estudios a nivel articular y enfermedad discal.^{175,266,267,268} En el estudio de Harman sobre osteoartritis¹⁷⁵ se crearon dos grupos; en ambos permitiéndose el tratamiento con AINES, pero a uno de ellos se le administró células madre a una dosis de 12 millones y al otro suero salino. En los resultados se observó mejoría en ambos grupos, siendo esta significativa en los animales con terapia celular. La mejoría en los animales con salino se denominó efecto placebo o “cuidador”, y se ha descrito por el 43,1% de los

veterinarios que han valorado el dolor a la manipulación de una articulación y en un 56,9% de los dueños de estos animales.²⁶⁹ A nivel de la articulación coxofemoral²⁶⁶ se infundió una dosis de 5 millones y se observó que a los 90 días este grupo de animales presentaba una mejoría significativa tanto en el dolor a la manipulación como en la cojera cuando se comparaba con el grupo placebo. En ambos grupos se permitió el tratamiento con AINES, siempre y cuando se hubiesen administrado 14 días antes del estudio y se continuara con la misma dosis a lo largo de los meses. A nivel toraco-lumbar se han realizado estudios sobre la enfermedad discal de grado 5 o sin sensibilidad profunda.²⁶⁸ En este caso se aplicó terapia celular en el parénquima de la médula previo al cierre de la incisión de la cirugía, y se comparó con un grupo de animales que no la recibió. Los resultados a los 6 meses fue que aquellos animales a los que se les sometió a cirugía junto con terapia celular mostraron una mayor tasa de éxito y una recuperación más rápida que aquellos que solo fueron sometidos a cirugía.²⁶⁸

En este estudio la descarga ocular con ambas terapias mostró una reducción a los 45 días, pero sin haber diferencias entre ellas. Esta reducción fue del 14% con la terapia médica y de un 25% con la terapia celular. En los meses siguientes se alcanzaron los mejores valores con la terapia celular, reduciéndose un 6% más a los 6 meses tras la inoculación. A partir de este punto comenzó el empeoramiento de este grupo de animales y por lo tanto no hubo diferencias significativas con el tratamiento convencional. En esta variable el uso de la terapia celular favoreció el mantener unos valores más estables a lo largo de los diferentes puntos de control en comparación con la terapia médica.

En la hiperemia se observaron diferencias entre ambas terapias desde el primer punto de control hasta los 6 meses, con una reducción del 19% en los animales con tratamiento médico y de un 41% los de terapia celular. Fue a los 45 días cuando se alcanzaron los mejores valores con ambas terapias, para luego ir empeorando de forma progresiva con un incremento de la hiperemia del 5% en la terapia médica y de forma más aguda con un 16% en la terapia celular, hasta que a los 9 meses no hubo diferencias significativas entre ambas.

El uso de la terapia celular mejoró de forma significativa y en poco tiempo esta variable, que junto con la descarga ocular son los principales síntomas que observan los dueños en los animales que presentan QCS. Mientras ciertas variables

mejoraron a corto plazo, en el edema se observaron diferencias significativas en el ecuador del estudio, es decir, a los 6 meses. La terapia celular dio lugar a mejores valores que con la terapia médica, para luego empeorar de forma aguda, al contrario que con el tratamiento tópico, que se mantuvo en unos valores estables a lo largo del año.

Resultados similares se han observado en la aplicación intra-articular para el tratamiento de la osteoartritis²⁶⁷, en donde los animales que recibieron tratamiento celular mesenquimal de origen adiposo mostraron una mejoría significativa a los 30 días post infusión, pero que a los 3 meses los animales empeoraban hasta estadios iniciales. Aún así, comparándolo con el grupo placebo de dicho estudio, los resultados de estos últimos fueron peores, habiendo diferencias significativas entre ambos grupos a los 3 y 6 meses del estudio. También se observó una mejoría temprana en el primer mes del tratamiento con respecto a las variables de dolor en la manipulación y rango de movimiento.²⁶⁶ En dicho estudio, aunque su duración fue solo de 3 meses, las variables citadas mejoraron de forma significativa y alcanzaron su mejor valor al mes de la administración de la terapia celular.

El tiempo de persistencia de las células madre en la zona de inoculación es muy variable, al igual que su migración a órganos vecinos.²²⁸ El tiempo que permanecen estas células en el lugar de inoculación puede explicar la pérdida de efecto de este tipo de terapias al cabo del tiempo. Estudios *in vivo* a nivel perilacrimal e intra-articular han demostrado que el pico de fluorescencia de estas células mesenquimales de origen adiposo se observaba a las dos semanas post inyección, para luego ir disminuyendo a partir de la tercera semana. En el caso del *ex vivo*, la persistencia de la fluorescencia fue de más de cuatro semanas desde la última administración de la terapia celular.²²⁸ La diferencia entre ambos pudo ser debida a la capacidad de penetración del fluorescente en los tejidos, el cual se ve afectado por la hiperpigmentación de la piel, además de un porcentaje de muerte celular de dichas células adiposas mesenquimales tras la inoculación.²⁷⁰

Estudios comparando el efecto de la terapia celular frente al placebo se han realizado en otras especies como en el caso de los équidos y en los felinos.^{181,183,271} Concretamente en la especie felina se han usado células mesenquimales de origen adiposo para el tratamiento de la enfermedad renal crónica y la enfermedad intestinal inflamatoria.^{181,183} En ambos estudios la administración fue intravenosa a una dosis

de 2×10^6 células por kilogramo de peso, y en donde se permitió, tanto al grupo tratado como al placebo, el continuar con sus tratamientos de soporte y dietas específicas, siempre y cuando no sufriesen variaciones previas y durante el periodo de estudio. En el caso de la enfermedad renal crónica, no se observaron cambios significativos en aquellos parámetros que se evaluaron, mientras que en la enfermedad inflamatoria intestinal sí que se observaron estas diferencias entre ambos grupos al mes y dos meses tras la infusión celular.^{181,183}

En resumen, la puntuación total con ambos tratamientos mejoró, con una reducción evidente de los signos clínicos a los 45 días del 27% con la terapia médica y del 39% con la terapia celular. Posteriormente el grupo con el tratamiento convencional se mantuvo estable, mientras aquellos con la infusión celular siguieron mejorando reduciéndose un 5% más los signos clínicos a los 3 meses de la inoculación. En este punto de control se observaron ya diferencias significativas entre ambas terapias, y que continuaron durante 3 meses más en el estudio, hasta que a los 9 meses hubo un empeoramiento del 20% con respecto al punto de control 2 (3 meses) y sin haber ya diferencias entre ambas terapias.

Por lo tanto su aplicación como terapia adyuvante favorece el poder reducir la pauta de gotas, que en muchas ocasiones es difícil para el propietario llevarla a cabo. También ofrece mejores resultados que el uso del tratamiento convencional, no sólo en una mayor reducción de los signos clínicos, sino también en prolongar esta mejoría a lo largo de los meses. Aunque dicha mejoría presenta un límite a los 6 meses, empeorando de forma más aguda, por lo que en base a este estudio se recomendaría una nueva aplicación de la terapia celular en ese tiempo.

7. Limitaciones del estudio

Como cualquier estudio clínico, este estudio tiene una serie de limitaciones a considerar.

El estudio llevado a cabo no ha contado con financiación específica proveniente de programas de financiación de la investigación, sino que se emplearon fondos propios de los grupos de investigación implicados. Ello ha implicado que los propietarios de los pacientes candidatos debían asumir parte de los costes del tratamiento celular, lo que puede haber sesgado los resultados y ha limitado el número de animales a incluir. Igualmente ha impedido la aleatorización y

enmascaramiento a la hora de aplicar los tratamientos. Asimismo, solo se aplicaron la dosis de 5 y 10×10^6 en la glándula de la membrana nictitante y orbital respectivamente, por lo que sería ideal más grupos con diferentes dosis para poder comparar entre las diferentes concentraciones. Lo mismo ocurre con el tratamiento médico, que en este caso sólo se usó la ciclosporina al 2%, por lo que sería ideal poder comparar la terapia celular con ciclosporina 0,02% (Optimmune®), ya que en ciertos países solo tienen acceso a esta presentación comercial. Lo mismo ocurre con otros inmunomoduladores que se usan para la queratoconjuntivitis seca como el tacrólimus.

La disponibilidad de estudios inmunofenotipados, genéticos y moleculares a partir de sangre periférica y/o de muestras de biopsia de las glándulas a diferentes tiempos, así como la evaluación y utilización de marcadores de inflamación, hubiera podido también desvelar los mecanismos implicados en las diferentes respuestas identificadas y, particularmente, caracterizar los mecanismo de acción de la infusión celular.

Con respecto a parámetros oftalmológicos, podría haber aportado información de utilidad la determinación del tiempo de ruptura de lágrima, ya que nos indica la calidad de la lágrima del paciente; y en menor medida la realización de la meibometría.

Conclusiones

1. La escala clínica para pacientes caninos con queratoconjuntivitis seca propuesta en este estudio permite una estadificación objetiva de los pacientes con dicha enfermedad, lo que facilita su comparación al diagnóstico, la toma de decisiones terapéuticas y el seguimiento de su evolución a lo largo del tiempo.
2. El estudio de validación realizado indica que es una escala con adecuada fiabilidad y concordancia, incluso si su aplicación no corre a cargo de oftalmólogos veterinarios experimentados.
3. El tratamiento médico mediante ciclosporina al 2% y lágrima artificial produce mejoría clínica significativa más acentuada al inicio del tratamiento, suavizándose los beneficios a partir de los 3 meses de tratamiento.
4. La administración de células madre mesenquimales a nivel de la glándula orbital y de la membrana nictitante es un proceso factible y seguro para el paciente.
5. La administración local única de células madre mesenquimales adipogénicas como adyuvante del tratamiento médico en animales crónicos produce una mejoría clínica sostenida, suavizándose los beneficios a partir de los 6 meses de tratamiento.
6. La mejoría clínica inducida por el tratamiento con células madre es significativamente superior al inducido por la terapia médica sola durante los primeros 6 meses.
7. En base a los resultados, podría recomendarse la terapia local con células madre mesenquimales para inducir respuesta clínica más profunda y reducir la necesidad de terapia médica en perros con queratoconjuntivitis seca inmunomediada, siendo recomendable una segunda administración a los 6 meses de la primera.



Bibliografía

1. Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JA, Dana MR (2003). Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol*; 136: p.318-326
2. Behrens A, Doyle J.J, Stern L, Chuck R.S, McDonnell P.J, Azar D.T, Dua H.S, Hom M, Karpecki P.M, Laibson P.R, Lemp M.A, Meisler D.M, Del Castillo J.M, O'Brien T.P, Pflugfelder S.C, Rolando M, Schein O.D, Seitz B, Tseng S.C, Setten G, Wilson S.E, Yiu S.C, Dysfunctional tear syndrome study group (2006). Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea*; 25(8): p.900-907
3. Yu J, Asche C.V, Fairchild C.J (2011). The economic burden of dry eye disease in the United States: a decision tree analysis. *Cornea*, 30, p.379-387
4. U.S. Census Bureau (2004). U.S. Interim Projections by Age, Sex, Race, and Hispanic. Statistical Abstract of the United States, <http://www.census.gov/ipc/www/usinterimproj/>
5. Reddy P, Grad O, Rajagopalan (2004). The economic burden of dry eye: a conceptual framework and preliminary assessment. *Cornea*; 23: p.751-761
6. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL (2000). Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*; 118: p.615-621
7. Maggs D (2018). The integrated functional lacrimal unit. ECVO Annual Scientific Meeting. Florence: p.27-32
8. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *Ocul Surf* 2007, 5, p.75-92
9. Williams DL (2008). Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 38: p.251-268
10. Schirmer O (1903). Studien zur Physiologic und Pathologie der Tränenabsonderung und Tränenabfuhr. *Albrecht Graefes Archiv Ophthalmol*; 56: p.197-291
11. Williams DL (2005). Analysis of tear uptake by the Schirmer tear test strip in the canine eye. *Vet Ophthalmol*; 8: p.325-330
12. Giuliano E.A. Diseases and Surgery of the canine lacrimal secretory system. En Gelatt KN, Gilger BC and Kern TJ (ed): *Veterinary Ophthalmology*. 5ª edición. Iowa, Wiley-Blackwell, 2013; p. 912-944

13. Olivero DK, Davidson MG, English RV, Nasisse MP, Jamieson VE, Gerig TM (1991). Clinical evaluation of 1% cyclosporine for topical treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Ass*; 199: p.1039-1042
14. Berdoulay A, English RV, Nadelstein B (2005). Efecto of topical 0,02% tacrolimus aqueous suspensión on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthal*; 8(4): p.224-232
15. Aggarwal S, Pittenger MF (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses. *Blood*; 105: p.1815-1822
16. Semedo P, Wng PM, Andreucci TH, Cenedeze MA, Teixeira VPA, Reis MA, Pacheco-Silva A, Camara NOS (2007). Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc*; 39: p.421-423
17. Tighe A, Williams DL (2018). Analysis of lymphocyte population in nictitans glands of dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol*; 8(1): p.47-52
18. Zoukhri D (2006). Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res*; 82(5): p.885-898
19. Volk SW, Theoret C (2013). Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regen*; 21: p.382-394
20. Villatoro A.J, Fernández V, Claros S, Rico-Llanos G.A, Becerra J, Andrades J.A (2015). Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *Biomed Res Int*; 2015: 527926
21. Bittencourt M.K, Barros M.A, Martins J.F, Vasconcellos J.P, Morais B.P, Pompeia C, Bittencourt M.D, Evangelho K.D, Kerkis I, Wenceslau C.V (2016). Allogenic mesenchymal stem cell transplantation in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Cell Med*; 8(3): p.63-77
22. López-Lucas MD. Células madre mesenquimales de médula ósea fucosiladas. ¿Es posible una producción a escala clínica? Tesis doctoral. Universidad de Murcia, Facultad de Medicina, 2016.
<https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/47815/6/TESIS%20160602.pdf>

23. Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 477/2014. Regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2014/06/13/477>
24. Cook Cs. Ocular embryology and congenital malformations. En Gelatt KN, Gilger BC and Kern TJ (ed): *Veterinary Ophthalmology*, 5ª edición. Iowa, Wiley-Blackwell, 2013, p.3-38
25. Ofri R. Development and congenital abnormalities. En Maggs DJ, Miller PE, Ofri R (ed): *Slatter Fundamentos de la Oftalmología Veterinaria*, 5ª edición, St Louis, Elsevier, 2013, p.13-25
26. Lucarelli MJ, Dartt DA, Cook BE, Lemke BN. Sistema lacrimal. En Kaufman PL, Alm A (ed): *Adler Fisiología del Ojo*, 10ª edición. Madrid, Elsevier, 2004, p.31-43
27. Cook CS, Ozanic V, Jakobiec F. Prenatal development of the eye and its anexa. In Jakobiec F (ed): *Ocular anatomy, embryology and teratology*, Philadelphia, Harper and Row, 1982
28. Park S, Taylor KT, Zwingenberger AL, Reilly CM, Toupadakis CA, Manfurt CF, Good KL, Murphy CJ (2016). Gross anatomy and morphometric evaluation of the canine lacrimal and third eyelid gland. *Vet Ophthalmol*, 19: p.230-236
29. Cabral VP, Laus JL, Dagli MZ, Pereira GT, Talieri IC, Monteiro ER, Mamede FV (2005). Canine lacrimal and third eyelid superficial gland's macroscopic and morphometric characteristics. *Cienc.Rural*, 35: p.391-397
30. Giuliano EA (2016). Physiology of the tear film and anexa. William Magrane Basic Science Course in Veterinary and Comparative Ophthalmology. Raleigh, Carolina del Norte, p.1-16
31. Cheng S, Kuchiiwa S, Kuchiiwa T et al (2003). Three novel pathways to the lacrimal glands of the cat: an investigation with cholera toxin B subunit as a retrograde tracer. *Brain Res*, 873: p.160-164
32. Powell CC, Martin CL (1989). Distribution of cholinergic and adrenergic nerve fibers in the lacrimal glands of dog. *Am JVet Res*, 50: p.2084-2088
33. Dartt DA, Hodges RR, Zoukhri D (1998). Signal transduction pathways activated by cholinergic and alpha 1-adrenergic agonists in the lacrimal gland. *Adv Exp Med Biol*, 438: p.113-122

34. Davidson M (2016). Neurology of Lacrimation. William Magrane Basic Science Course in Veterinary and Comparative Ophthalmology. Raleigh, Carolina del Norte, p.5-9
35. Scott G, Balsiger H, Kluckman M, Fan J, Gest T (2014). Patterns of innervation of the lacrimal gland with clinical application. *Clin Anat*, 27: p.1174-1177
36. Dartt DA (1994). Regulation of the tear secretion. *Adv Exp Med Biol*, 350, p.1-10
37. Dart D.A. Formation and function of the tear film. En: Levin L, Nilson S, Ver Hoeve J, Wu S (ed): Adler's Physiology of the eye, 11 edición. New York, Saunders Elsevier, 2011, p.350-362
38. Sack R.A, Beaton A, Sathe S, Morris C, Willcox M, Bogart B (2000). Towards a closed eye model of the pre-ocular tear layer. *Prog Retin Eye Res*, 19: p.649-668
39. Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi M, Voon LW (2004). Functional aspect of the tear lipid layer. *Exp Eye Res*; 78: p.347-360
40. Wang J, Aquavella J, Palakuru J, Chung S, Feng C (2006). Relationships between central tear film thickness and tear menisci of the upper and lower eyelids. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47: p.4349-4355
41. Beckwith-Cohen B, Elad D, Bdolah-Abram T, Ofri R (2014). Comparison of tear pH in dogs, horses and cattle. *Am J Vet Res*, 75: p.494-499
42. Murphy CJ, Samuelson DA, Pollock R.V.H. The eye. En: Evans H.E DeLahunta A (ed): Miller's Anatomy of the dog. 4ª edición. Elsevier Saunders, 2012.p.746-785
43. Miller P.E. Lacrimal system. En Maggs D.J, Miller P.E, Ofri R (ed): Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology, 5ª edición, St Louis, Elsevier Saunders, 2013, p.165-183
44. Driver P.J, Lemp M.A (1996). Meibomian gland dysfunction. *Surv Ophthalmol*, 40(5), p.343-367
45. Rantamaki A.H, Telenius J, Koivuniemi A, Vattulainen I, Holopainen J.M (2011). Lessons of the biophysics of interfaces: lung surfactant and tear fluid. *Prog Retin Eye Res*, 30: p.2014-215
46. Butovich I.A, Millar T.J, Ham B.M (2008). Understanding and analyzing meibomian lipids- a review. *Curr Eye Res*, 33: p.405-420
47. Ofri R, Orgard K, Kass P.H, Dikstein S (2007). Canine meibometry: establishing baseline values for meibomian gland secretions in dogs. *Vet Jour*, 174: p.536-540

48. Benz P, Tichy A, Nell B (2008). Review of the measuring precision of the new Meibometer MB550 through repeated measurements in dogs. *Vet Ophthalmol*, 11: p.368-374
49. Davidson H.J, Kuonen V.J (2004). The tear film and ocular mucins. *Vet Ophthalmol*, 7: p.71-77
50. Klenkler B, Sheardown H, Jones L (2007). Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology. *Ocul Surf*, 5: p.228-239
51. Winiarczyk M, Winiarczyk D, Banach T, Adaszek L, Madany J, Mackiewicz, Pietras-Ozga D, Winiarczyk S (2015). Dog tear film proteome in-depth analysis. *PLOS ONE*. DOI: 10.1371: p.1-15
52. Gregory MS. Innate Immune System and the eye. En: Immunology, Inflammation and Diseases of the Eye (ed): Dartt DA, Dana R, D'Ámore P, Niederkorn J. Elsevier, 2010 : p.18-24
53. Mircheff A.K (1989). Lacrimal fluid and electrolyte secretion: a review. *Curr Eye Res*, 8: p.607-617
54. Roberts SR, Erickson O.F (1962). Dog tear secretion and tear proteins. *J Small Anim Pract*, 3: p.1
55. Bron AJ, Seal DV (1986). The defense of the ocular surface. *Trans Ophthalmol Soc UK*, 105: p.18-25
56. Knop E, Knop N (2007). Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy*, 92: p.36-49
57. Brighman A.H, Wachsstock RS, Erskine R (1991). Lysozyme concentrations in the tears of cattle, goats and sheep. *Am J Vet Res*, 52: p.9-11
58. Marts B.S, Bryan G.M, Prieto D.J (1977). Schirmer tear test measurements and lysozyme concentration in equine tears. *J Eq Med Sur*, 1: p.427-432
59. Ford L.C, De Lange R.J, Petty R.W (1976). Identification of a nonlysozymal bactericidal factor (betalysin) in human tears and aqueous humor. *Am J Ophthalmol*, 81: p.30-33
60. Banyard MRC, McKenzie H.A (1982). The fractionation and characterization of bovine tear proteins, especially lactoferrin. *Mol Cell Biochem*, 47: p.115-124
61. Selinger D.S, Selinger R.C, Reed W.P (1979). Resistance to infection of the external eye: role tears. *Surv Ophthalmol*, 24: p.33-38
62. Eichenbaum J.D, Lavach J.D, Severin G.A, Paulsen M.E (1987). Immunology of the ocular surface. *Comp Cont Educ*, 9(11): p.1101-1109

63. McClellan B.H, Whitney C.R, Newman L.P, Allansmith M.R (1973). Immunoglobulins in tears. *Am J Ophthalmol*, 76: p.89-101
64. Chandler J.W, Gillete T.E (1983). Immunologic defense mechanisms of the ocular surface. *Ophthalmol*, 90: p.585-591
65. German A.J, Hall E.J, Day M.J (1998). Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saline, tears and bile. *Vet Immunol Immunopathol*, 64: p.107-121
66. De Souza G.A, Godoy L.M.F (2006). Identification of 491 protein in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Gen Biol*, 7: p.72
67. Ollivier F.J, Gilger B.C, Barrie K.P, Kallberg M.E, Plummer C.E, O'reilly S, Gelatt K.N, Brooks D.E (2007). Proteinases of the cornea and precorneal tear film. *Vet Ophthalmol*, 10: p.199-206
68. Saito A, Izumiwasa Y, Yamashita K, Kotani T (2001). The effect of third eyelid gland removal on the ocular surface of dogs. *Vet Ophthalmol*, 4, p.13-18
69. Helper L.C, Magrane W.G, Koehm J, Johnson R (1974). Surgical induction of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *J Am Vet Med Assoc*, 165: p.172-174
70. Payne A.P (1994). The Harderian gland: a tercentennial review. *J Anat*, 185, p.1-49
71. Hittmair K.M, Tichy A, Nell B (2014). Ultrasonography of the Harderian gland in the rabbit, guinea pig and chinchilla. *Vet Ophthalmol*, 17(3): p.175-183
72. Moore C.P, Wilsman N.J, Nordheim E.V, Majors L.J, Collier L.L (1987). Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28: p.1925-1932
73. Gipson I.K, Argüeso P (2003). Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. *Int Rev Cytol*, 231: p.1-49
74. Guzman-Aranguéz A, Argüeso P (2010). Structure and biological role of mucin-type O-glycans at the ocular surface. *Ocul Surf*, 8: p.8-17
75. Nichols B.A, Chiappino M.L, Dawson C.R (1985). Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26: p.464-473
76. Ashutosh S (1993). Energetics of corneal epithelial cell-ocular mucus-tear film interactions: some surface-chemical pathways of corneal defense. *Biophys Chem*, 47: p.87-99

77. Watanabe H (2002). Significance of mucin on the ocular surface. *Cor*, 21: p.17-22
78. Gipson I.K (2004). Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res*, 78: p.379-388
79. Argueso P, Guzman-Aranguez A, Mantelli F, Cao Z, Ricciuto J, Panjwani N (2009). Association of cell surface mucins with galectin-3 contributes to the ocular surface epithelial barrier. *J Biol Chem*, 284: p.23037-23045
80. Royle L, Matthews E, Corfield A, Berry M, Rudd P.M, Dwek R.A, Carrington S.D (2008). Glycan structures of ocular surface mucins in man, rabbit and dog display species differences. *Glycoconj J*, 25: 763-773
81. Hicks S.J, Corfield A.P, Kaswan R.L, Hirsh S, Stern M, Bara J, Carrington S.D (1998). Biochemical analysis of ocular surface mucin abnormalities in dry eye: the canine model. *Exp Eye Res*, 67: p.709-718
82. Gipson I.K, Yankauckas M, Spurr-Michaud S.J, Tisdale A.S, Rinehart W (1992). Characteristics of a glycoprotein in the ocular surface glycocalyx. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33: p.218-227
83. Diebold Y, Rios J.D, Hodges R.R, Rawe I, Dartt D.A (2001). Presence of nerves and their receptors in mouse and human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(10): p.2270-2282
84. Rios J.D, Zoukhri D, Rawe I.M, Hodges R.R, Zieske J.D, Dartt D.A (1999). Immunolocalization of muscarinic and VIP receptor subtypes and their role in stimulating goblet cell secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(6): p.1102-1111
85. Kanno H, Horikawa Y, Hodges R.R, Zoukhri D, Shatos M.A, Rios J.D, Dartt D.A (2003). Cholinergic agonists transactivate EGFR and stimulate MAPK to induce goblet cell secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(4): p.988-998
86. Dartt D.A, Rios J.D, Kanno H, Rawe I.M, Zieske J.D, Ralda N, Hodges R.R, Zoukhri D (2000). Regulation of conjunctival goblet cell secretion by Ca^{2+} and protein kinase C. *Exp Eye Res*, 71(6): p.619-628
87. Jumblatt J, Jumblatt M (1998). Detection and quantification of conjunctival mucins. *Adv Exp Med Biol*, 438: p.239-246
88. Hodges R.R, Horikawa Y, Rios J.D, Shatos M.A, Dartt D.A (2007). Effect of protein kinase C and Ca^{2+} on p42/p44 MAPK, Pyk2, and Src activation in rat conjunctival goblet cells. *Exp Eye Res*, 85(6): p.836-844
89. Horikawa Y, Shatos M.a; hodges R.R, Zoukhri D, Rios J.D, Chang E.L, Bernardino C.R, Rubin P.A, Dartt D.A (2003). Activation of mitogen-activated

- protein kinase by cholinergic agonists and EGF in human compared with rat cultured conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(6): p.2535-2544
90. Gu J, Chen L, Shatos M.A, Rios J.D, Gulati A, Hodges R.R, Dartt D.A (2008). Presence of EGF growth factors ligands and their effects on cultured rat conjunctival goblet cell proliferation. *Exp Eye Res*, 86(2): p.322-334
91. Shatos M.A, Gu J, Hodges R.R, Lashkari K, Dartt D.A (2008). ERK/p44p42 mitogen-activated protein kinase mediates EGF-stimulated proliferation of conjunctival goblet cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49: p. 3351-3359
92. Hosoya K, Horibe Y, Kim K.J, Lee V.H (1997). Na⁺ -dependent L-arginine transport in the pigmented rabbit conjunctiva. *Exp Eye Res*, 65(4): p.547-553
93. Dartt DA (2002). Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells. *Prog Ret Eye Res*; 21: p.555-576
94. Turner H.C, Alvarez L.J, Candia O.A. (2001) Identification and localization of acid-base transporters in the conjunctival epithelium. *Exp Eye Res*, 72(5): p.519-531
95. Turner H.C, Alvarez L.J, Bildin V.N, Candia O.A (2000). Immunolocalization of Na-K-ATPase, Na-K-CL and Na-glucose cotransporters in the conjunctival epithelium. *Curr Eye Res*, 21(5): p.843-850
96. Kompella U.B, Kim K.J, shiue M.H, Lee V.H (1996). Cyclic AMP modulation of active ion transport in the pigmented rabbit conjunctiva. *J Ocul Pharmacol Ther*, 12(3): p.281-287
97. Shiue M.H, Kim K.J, Lee V.H (1998). Modulation of chloride secretion across the pigmented rabbit conjunctiva. *Exp Eye Res*, 66(3): p.275-282
98. Wu K, Jerdeva G.V, da Costa S.R, Sou E, Schechter J.E, Hamm-Alvarez S.F (2006). Molecular mechanisms of lacrimal acinar secretory vesicle exocytosis. *Exp Eye Res*, 83(1): p.84-96
99. Zoukhri D, Hodges R.R, Sergheraert C, Dartt D.A (2000). Cholinergic-induced Ca²⁺ elevation in rat lacrimal gland acini is negatively modulated by PKCdelta and PKCepsilon. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(2): p.386-392
100. Hodges R.R, Zoukhri D, Sergheraert C, Zieske J.D, Dartt D.A (1997). Identification of vasoactive intestinal peptide receptor subtypes in the lacrimal gland and their signal-transducing components. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(3): p.610-619

101. Zoukhri D, Hodges R.R, Sergheraert C, Toker A, Dartt D.A (1997). Lacrimal gland PKC isoforms are differentially involved in agonist-induced protein secretion. *Am J Physiol*, 272: p.263-269
102. Funaki C, Hodges R.R, Dartt D.A (2007). Role of cAMP inhibition of p44/p42 mitogen-activated protein kinase in potentiation of protein secretion in rat lacrimal gland. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(5): p.1551-1560
103. Hodges R.R, Shatos M.A, Tarko R.S, Vrouvlianis J, Gu J, Dartt D.A (2005). Nitric oxide and cGmp mediate alpha 1D-adrenergic receptor-stimulated protein secretion and p42/p44 MAPK activation in rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(8): p.2781-2789
104. Hodges R.R, Dicker D.M, Rose P.E, Dartt D.A (1992). Alpha 1-adrenergic and cholinergic agonists use separate signal transduction pathways in lacrimal gland. *Am J Physiol*, 262: p.1087-1096
105. Chen L, Hodges R.R, Funaki C, Zoukhri D, Gaivin R.J, Perez D.M, Dartt D.A (2006). Effects of alpha 1D-adrenergic receptor son shedding of biologically active EGF in freshly isolated lacrimal gland epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(5): p.946-956
106. Selvam S, Thomas P.B, Gukasyan H.J, Yu A.S, Stevenson D, Trousdale M.D, Mircheff A.K, Schechter J.E, Smith R.E, Yiu S.M (2007). Transepithelial bioelectrical properties of rabbit acinar cell monolayers on polyester membrane scaffolds. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293: p.1412-1419
107. Yiu S.C, Lambert R.W, Tortoriello P.J, Mircheff A.K (1991). Secretagogue-induced redistributions of Na, K-ATPase in rat lacrimal acini. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32(11): p.2976-2984
108. Toth-Molnar E, Venglovezc V, Ozsvari B, Rakonczay Z, Varro A, Papp J.G, Toth A, Lonovics J, Takacs T, Ignath I, Ivanyi B, Hegyi P (2007). New experimental methods to study acid/base transporters and their regulation in lacrimal gland ductal epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(8): p.3746-3755
109. Seifert P, Spitznas M (1996). Immunocytochemical and ultrastructural evaluation of the distribution of nervous tissue and neuropeptides in the meibomian gland. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234(10): p.648-656
110. Sullivan D.A, Sullivan B.D, Ullman M.D, Rocha E.M, Krenzer K.L, Cermak J.M, Toda I, Doane M.G, Evans J.E, Wickham L.A (2000). Androgen influence on the meibomian gland. *Inves Ophthalmol Vis Sci*, 41(12): p.3732-3742

111. Helper L.C (1976). Keratoconjunctivitis sicca in dogs. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 81: p.624-628
112. Helper L.C (1996). The tear film in the dog. Causes and treatment of diseases associated with overproduction and underproduction of tears. *Animal Eye Res*, 15: p.5-11
113. Kaswan R, Pappas C Jr, Wall K, Hirsh S.G (1998). Survey of canine tear deficiency in veterinary practice. *Adv Exp med Biol*, 438: p.931-939
114. Peirce V, Harmer E, Williams D.L. Prevalence of keratoconjunctivitis in the canine population: Schirmer tear tests in one thousand normal dogs. *Veterinary Journal* submitted
115. Kaswan R.L, Martin C.L, Dawe D.L (1985). Keratoconjunctivitis sicca: immunological evaluation of 62 canine cases. *Am J Vet Res*, 46: p.376-383
116. Herrera H.D, Weichsler N, Gómez J.R, de Jalón J.A (2007). Severe, unilateral, unresponsive keratoconjunctivitis sicca in 16 juvenile Yorkshire Terriers. *Vet Ophthalmol*, 10(5): p.285-288
117. Trepanier L.A (2004). Idiosyncratic toxicity associated with potentiated sulfonamides in the dog. *J Vet Pharmacol Ther*, 27: p.129-138
118. Klauss G, Giuliano E.A, Moore C.P, Charles M, Stuhr C.M, Martin S.L, Tyler J.W, Fitzgerald K.E, Crawford D.A (2006). Canine keratoconjunctivitis sicca associated with etodolac administration. *J Am Vet Med Assoc*, 230: p.541-547
119. Hollingsworth S.R, Canton D.D, Buyukmihci N.C, Farver T.B (1992). Effect of topically administered atropine on tear production in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 200: p.1481-1484
120. Matheis F.L, Walser-Reinhardt L, Spiess B.M (2012). Canine neurogenic keratoconjunctivitis sicca: 11 cases (2006-2011). *Vet Ophthalmol*, 15(4): p.288-290
121. De Almeida D.E, Roveratti C, Brito F.L.C, Godoy G.S, Duque J.C.M, Bechara G.H, Laus J.L (2009). Conjunctival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol*, 12: p.211-215
122. Williams D.L, Pierce V, Mellor P, Heath M.F (2007). Reduced tear production in three canine endocrinopathies. *J Small Animal Pract*, 48: p.252-256
123. Gemensky-Metzler A.J, Sheahan J.E, Rajala-Schultz P.J, Wilkie D.A, Harrington J (2015). Retrospective study of the prevalence of keratoconjunctivitis

- sicca in diabetic and nondiabetic dogs after phacoemulsification. *Vet Ophthalmol*, 18(6): p.472-480
124. Fox R.I (2000). Sjögren's syndrome: current therapies remain inadequate for a common disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 9: p.2007-2016
125. Tsubota K, Fujihara T, Takeuchi T (1997). Soluble interleukin-2 receptors and serum autoantibodies in dry eye patients: correlation with lacrimal gland function. *Cornea*, 16: p.339-344
126. Fox R.I, Stern M, Michelson P (2000). Update in Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*, 12: p.391-398
127. Stern M.E, Gao J, Schwalb T.A, Ngo M, Tieu D.D, Chan Ch, Reis B.L, Whitcup S.M, Thompson D, Smith J.A (2002). Conjunctival T-cell subpopulations in Sjögren's and non-Sjögren's patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(8): p.2609-2614
128. Bacman S, Berra A, Sterin-Borda L, Borda E (2001). Muscarinic acetylcholine receptor antibodies as a new marker of dry eye Sjogren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42: p.321-327
129. Kaswan RL, Martin CL, Chapman WL Jr (1984). Keratoconjunctivitis sicca: histopathologic study of nictitating membrane and lacrimal glands from 28 dogs. *Am J Vet Res*, 45 (1): p.112-118
130. Gao J, Schwalb T.A, Addeo J.V, Ghosn C.R, Stern M.E (1998). The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical cyclosporin A therapy. *Cornea*; 17(6): p.654-663
131. Biroş D (2013). Keratoconjunctivitis sicca or dry eye. ECVO Annual Scientific Meeting, Barcelona: p.45-47
132. Ogawa N, Dang H, Lazaridis K, McGuff H.S, Aufdemorte T.B, Talal N (1995). Analysis of transforming growth factor beta and other cytokines in autoimmune exocrinopathy (Sjögren's syndrome). *J Interferon Cytokine Res*; 15(9): p.759-767
133. Konttinen Y.T, Kempainen P, Koski H, Li T.F, Jumppanen M, Hietanen J, Santavirta S, Salo T, Larsson A, Hakala M, Sorsa T (1999). Th1 cytokines are produced in labial salivary glands in Sjögren's syndrome, but also in healthy individuals. *Scand J Rheumatol*; 28(2): p.106-112

134. Zoukhri D, Hodges R.R, Byon D, Kublin C.L (2002). Role of proinflammatory cytokines in the impaired lacrimation associated with autoimmune xerophthalmia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 43(5): p.1429-1436
135. Barabino S, Dana M.R (2004). Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 45(6): p.1641-1646
136. Jabs D.A, Enger C, Predergast R.A (1991). Murine models of Sjogren's syndrome. Evolution of the lacrimal gland inflammatory lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 32: p.371-380
137. Jabs D.A, Lee B, Whittum-Hudson J, Prendergast R.A (2001). The role of Fas-Fas ligand- mediated apoptosis in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MpJ mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42(2): p.399-401
138. Nguyen K.H, Brayer J, Cha S, Diggs S, Yasunari U, Hilal G, Peck A.B, Humphreys-Beher M.G (2000). Evidence for antimuscarinic acetylcholine receptor antibody-mediated secretory dysfunction in nod mice. *Arthritis Rheum*; 43(10): p.2297-2306
139. Ishikawa Y, Eguchi T, Skowronski M.T, Ishida H (1998). Acetylcholine acts on M₃ muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin 5 water channel via cytosolic Ca²⁺ elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun*; 245: p.835-840
140. Rosignoli F, Roca V, Meiss R, Leceta J, Gomariz R.P, Pérez Leirós C (2005). Defective signalling in salivary glands precedes the autoimmune response in the non-obese diabetic mouse model of sialadenitis. *Clin Exp Immunol*; 142(3): p.411-418
141. Sánchez R.F, Innocent G, Mould J, Billson F.M (2007). Canine keratoconjunctivitis sicca: disease trends in a review of 229 cases. *J Small Anim Pract*; 48(4): p.211-217
142. Saito A, Kotani T (2001). Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. *Vet Ophthalmol*; 4: p.7-11
143. Hamor R.E, Roberts S.M, Severin G.A, Chavkin M.J (2000). Evaluation of results for Schirmer tear test conducted with and without application of a topical anesthetic in clinically normal dogs of 5 breeds. *Am J Vet Res*; 61(11): p.1422-1425

144. Gelatt K.N (1972). Vital staining of the canine cornea and conjunctiva with rose Bengal. *J Am Anim Hosp Assoc*; 8: p.17-22
145. Thomasy S.M, Stewart K.A, Murphy C.J (2018). Advanced diagnostic testing for ocular surface disorders. ECVO Annual Scientific Meeting, Florencia: p.33-36
146. Sebbag L, Park S.A, Kass P.H, Maggs D.J, Attar M, Murphy C.J (2017). Assessment of tear film osmolarity using the TearLabTM osmometer in normal dogs and dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol*; 20(4): p.357-364
147. Ofri R, Orgad K, Kass P.H, Dikstein (2007). Canine meibometry: Establishing baseline values for meibomian gland secretions in dogs. *Vet J*; 174: p.536-540
148. Oriá A.P, Raposo A.C.S, Araújo N.L.L.C, Lima F.B, Masmali A.M (2017). Tear ferning test in healthy dogs. *Vet Ophthalmol*; 7: p.1-8
149. Maggs D.J (2018). Disorders of the canine lacrimal unit. ECVO Annual Scientific Meeting, Florencia: p.75-84
150. Bernays M (1999). Unilateral keratoconjunctivitis sicca associated with parasympathetic nerve disruption in a dog. *Aus Vet Pract*; 29(1): p.15-20
151. Moore C.P (2004). Immunomodulating agents. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 34: p.725-737
152. Hendrix D.V.H, Adkins E.A, Ward D.A, Stuffle J, Skorobohach B (2011). An investigation comparing the efficacy of topical ocular applications of tacrolimus and cyclosporine in dogs. *Vet Med Int*: 487592
153. Ofri R, Lambrou G.N, Allgoewer I, Grenitz U, Peña T.M, Spiess B.M, Latour E (2009). Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: A comparison with cyclosporine A. *Vet J*; 179(1): P.70-77
154. Oliveira J.K, Williams D.L, Bollmann C, Seabra N.M, Bortolini M, Montiani-Ferreira F (2019). Comparative efficacy of topical oclacitinib 0.1% and tacrolimus 0.01 in canine keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol*; 22(5): P.633-643
155. Dreyfus J, Schobert C.S, Dubielzig R.R (2011). Superficial corneal squamous cell carcinoma occurring in dogs with chronic keratitis. *Vet Ophthalmol*; 14, p.161-168
156. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E (2006). MInimal criteria for

- defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*; 8(4): p.315-317
157. Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger P.S, Kramer M, Arnhold S (2012). Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow- derived mesenchymal stem cells—a comparative study. *Vet Res Commun*; 36: p.139-148
 158. Friedenstein A.J, Petrakova K.V, Kurolesova A.I, Frolova G.P (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*; 6: p.230-247
 159. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*; 25: p.2739-2749
 160. Kang J.W, Kang K.S, Koo H.C, Park J.R, Choi E.W, Park Y.H (2008). Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*; 17(4): p.681-693
 161. Berman D.M, Willman M.A, Han D, Kleiner G, Kenyon N.M, Cabrera O, Karl J.A, Wiseman R.W, O'Connor D.H, Bartholomew A.M, Kenyon N.S (2010). Mesenchymal stem cells enhance allogeneic islets engraftment in nonhuman primates. *Diabetes*; 59: p.2558-2568
 162. Khatri M, O'Brien T.D, Sharma J.M (2009). Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cell Dev*; 18: p.1485-1492
 163. Moreno R, Martínez-Gonzalez I, Rosal M, Farwati A, Gratacos E, Aran J.M (2010). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the rabbit fetal liver. *Stem Cells Dev*; 19: p.1579-1588
 164. Carrade D.D, Lame M.W, Kent M.S, Clark K.C, Walker N.J, Borjesson D.L (2012). Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. *Cell Med*; 4: p.1-11
 165. Glennie S, Soeiro I, Dyson P.J, Lam E.W, Dazzi F (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*; 105: p.2821-2827
 166. Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, Rosendahl K, Tammik C, Ringden O (2004). Mesenchymal stem cells inhibit

- expression of CD25 (interleukin 2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol*; 60: p.307-315
167. Ackerman A.L, Cresswell P (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol*; 5: p.678-684
168. Carrade D.D, Borjesson D.L (2013). Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp Med*; 63: p.207-217
169. Lee W.S, Suzuki Y, Graves S.S, Iwata M, Venkataraman G.M, Mielcarek M, Peterson L.J, Ikehara S, Torok-Storb B, Storb R (2011). Canine bone-marrow-derived mesenchymal stromal cell suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*; 17: p.465-475
170. Lu X, Wang X, Nian H, Yang D, Wei R. (2017) Mesenchymal stem cells for treating autoimmune dacryoadenitis. *Stem Cell Research & Therapy*; 8: p.126
171. Volk S.W, Theoret C (2013). Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regen*; 21: p.382-394
172. Van Loon V.J, Scheffer C.J, Genn H.J, Hoogendoorn A.C, greve J.W (2014). Clinical follow-up of horses treated with allogenic equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for different tendón and ligament disorders. *Vet Q*; 34(2): p.92-97
173. Davis AB, Schnabel LV, Gilger BC (2019). Subconjunctival bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a novel treatment alternative for equine immune-mediated keratitis: A case series. *Vet Ophthalmol*; 22(5): p.674-682
174. Muir P, Hans E.C, Racette M, Volstad N, Sample S.J, Heaton C, Holzman G, Schaefer S.L, Bloom D.D, Bleedorn J.A, Hao Z, Amene E, Suresh M, Hematti P (2016). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells modulate molecular markers of inflammation in dogs with cruciate ligament rupture. *Plos One*; 11(8): e0159095
175. Harman R, Carlson K, Gaynor J, Gustafson S, Dhupa S, Clement K, Hoelzler M, McCarthy T, Schwartz P, Adams C (2016). A prospective, randomized, masked, and placebo-controlled efficacy study of intraarticular allogenic adipose stem cells for the treatment of osteoarthritis in dogs. *Front Vet Sci*; 16: p.81
176. Penha E.M, Meira C.S, Guimaraes E.T, Mendonça M.V, Gravely F.A, Pinheiro C.M, Pinheiro T.M, Barrouin-Melo S.M, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares

- M.B (2014). Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. *Stem Cells Int*; 437521
177. Zeira O, Asiag N, Aralla M, Ghezzi E, Pettinari L, Martinelli L, Zahirpour D, Dumas M.P, Lupi D, Scacia S, Konar M, Cantile C (2015). Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary clinical findings. *J Neuroinflammation*; 12: p.181
178. Pogue B, Estrada A.H, Sosa-Samper I, Maisenbacher H.W, Lamb K.E, MIncey B.D, Erger K.E, Conlon T.J (2013). Stem-cell therapy for dilated cardiomyopathy: a pilot study evaluating retrograde coronary venous delivery. *J Small Anim Pract*; 54(7): p.361-366
179. Hall M.N, Rosenkrantz W.S, Hong J.H, Griffin C.E, Mendelsohn C.M (2010). Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet Ther*; 11(2): p.1-14
180. Pérez-Merino E.M, Usón-Casaús J.M, Duque-Carrasco J, Zaragoza-Bayle C, Mariñas-Pardo L, Hermida-Prieto M, Vilafranca-Compte M, Barrera-Chacón R, Gualtieri M (2015). Safety and efficacy of allogenic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Endoscopic and histological outcomes. *Vet J*; 206(3): p.391-397
181. Quimby J.M, Webb T.L, Randall E, Marolf A, Valder-Martinez A, Dow S.W (2016). Assessment of intravenous adipose-derived allogenic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. *J Feline Med Surg*; 18(2): p.165-171
182. Arzi B, Mills-Ko E, Verstraete F.J, Kol A, Walker N.J, Badgley M.R, Fazel N, Murphy W.J, Vapniarsky N, Borjesson D.L (2016). Therapeutic efficacy of fresh, autologous mesenchymal stem cells for severe refractory gingivostomatitis in cats. *Stem Cell Transl Med*; 5(1): p.75-86
183. Webb T.L, Webb C.B (2015). Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof of concept study. *J Feline Med Surg*; 17: p.901-908
184. Villatoro AJ, Claros S, Fernandez V, Alcoholado C, Fariñas F, Moreno A, Becerra J, Andrades JA (2018). Safety and efficacy of the mesenchymal stem cell in feline eosinophilic keratitis treatment. *BMC Vet Res*; 14(1): p.116

185. Herberts C.A, Kwa M.S, Hermsen H.P (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med*; 22: p.9-29
186. Park S.A, Peilly C.M, Wood J.A, Chung D.J, Carrade D.D, Deremer S.L, Seraphin R.L, Clark K.C, Zwingenberger A.L, Borjesson D.L, Hayashi K, Russell P, Murphy C.J (2013). Safety and immunomodulatory effects of allogenic canine adipose-derived mesenchymal stromal cell transplanted into the region of the lacrimal gland, the gland of the third eyelid and the knee joint. *Cytotherapy*, 15(12): p.1498-1510
187. López Alonso S.E, Morales Asencio JM (2005). ¿Para que se administran las escalas, cuestionarios, tests e índices?. *Index Enferm*, 14: p.48-49
188. Streiner DL, Norman GR, Cairney J. Validity. En: Health measurement scales (Ed): Inglaterra, Oxford University Press, 5ª edición, p.227-250
189. Fortin M, Nadeau M. La media de investigación. En: Fortin MF (ed): El proceso de investigación de la concepción a la realización, Mexico, McGraw-Hill Interamericana, 1999
190. Carvajal A, Centeno C, Watson R, Martínez M, Rubiales A.S (2011). ¿Cómo validar un instrumento de medida de la salud?. *Anales Sis San Navarra*, 34(1), p.63-72
191. Gómez C, Sánchez R (1998). Conceptos básicos sobre la validación de escalas. *Rev Colomb Psiquiatr*; 27: p.121-130
192. Sánchez R, Echeverry J (2004). Validación de escalas de medición en salud. *Rev Salud Pública*; 6: p.302-318
193. Pérez-Gil JA, Moscoso SC, Rodríguez RM (2000). Validez de constructo: el uso de análisis factorial exploratorio-confirmatorio para obtener evidencias de validez. *Psicothema*; 12 (2): p.442-446
194. Messick S (1980). Test validity and ethics of assessment. *Am Psycholo*; 35: p.1012-1027
195. IRIS Guidelines International Renal Interest Society. www.iris-kidney.com
196. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas AF, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasite & Vectors*; 4: p.86
197. Oliva G, Roura X, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*; 236(1): p.1192-1198

198. Jergens AE, Schreiner CA, Frank DE, Niyo Y, Ahrens FE, Eckersall PD, Benson TJ, Evans R (2003). A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med*; 17: p.291-297
199. Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, Hamlin R, Keene B, Luis-Fuentes V, Stepien R (2009). Guideline for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med*; 23: p.1142-1150
200. Kisiel AH, McDuffe LA, Masaoud E, Bailey TR, Esparza Gonzalez BP, Nino-Fong R (2012). Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *Am J Vet Res*; 73(8): p.1305-1317
201. Marx C, Silveira MD, Beyer Nardi N (2015). Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells Dev*. 2015 Apr 1;24(7): p.803-13.
202. Reich CM1, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S (2012). Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study. *Vet Res Commun*;36(2): p.139-48
203. Takemitsu H1, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T (2012). Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res*; 8:p.150
204. Morgado FF, Meireles JF, Neves CM, Amaral AC, Ferreira M.E (2017). Scale development: ten main limitations and recommendations to improve future research practices. *Psicologia*; 30: p.3
205. Gottlieb U, Brown M, Ferrier L (2014). Consumer perception of trade show effectiveness. *Europ J Market*; 48: p.89-107
206. Song JH, Uhm D, Yoon SW (2011). Organizational knowledge creation practice. *Leadership Org Develop J*; 32(3): p.243-259
207. Lucas-Carrasco R, Eser E, Hao Y, McPherson KM, Green A, Kullmann L (2011). The quality of care support for people with disability scale: development and psychometric properties. *Res Develop Disabilities*; 32: p.1212-1225
208. Schafer JL, Graham JW (2002). Missing data: our view of the state of the art. *Psycholo Methods*; 7(2): p.147-177

209. DeVellis RF. Scale Development. En: Scale Development: Theory and Applications. 2ª Edición. Londres.Thousand Oaks. Publicaciones Sage, 2003. Volumen 26
210. Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD, Fox PR, Häggstrom J, Fuentes VL, Oyama MA, Rush JE, Stepien R, Uechi M (2019). ACVIM Consensus Guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med*; 33(3): p.1127-1140
211. Kitamura Y, Maehara S, Nakade T, Miwa Y, Arita R, Iwashita H, Saito a (2018). Assessment of meibomian gland morphology by noncontact infrared meibography in Shih Tzu dogs with or without keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol*; 22(6): p.744-750
212. Giménez E, Bayón A, Gil-Chinchilla J.I, Garcia-Bernal D, Atucha NM, Talavera J (2017). Therapeutic potential of adipose-tissue derived mesenchymal stem cells in the treatment of canine keratoconjunctivitis siica: preliminary clinical observations. European Congress Veterinary Ophthalmology. Estoril: p.114
213. Giménez E, Bayón A, Gil-Chinchilla J.I, Garcia-Bernal D, Atucha NM, Talavera J (2019). Categorización de la queratoconjuntivitis seca inmunomediada en función de diferentes varibales. Congreso Colegio Latinoamericano Oftalmología Veterinaria. Medellin
214. Kim S, Thomasy SM, Ramsey D, Zhao M, Mannis MJ, Murphy CJ (2018). Whorl pattern keratopathies in veterinary and human patients. *Vet Ophthalmol*; 21(6): p.661-667
215. Otzen T, Manterola C (2017). Técnicas de muestreo sobre una población estudio. *Int J Morphol*; 35(1): p.227-232
216. Cortés-Reyes E, Rubio-Romero JA, Gaitán-Duarte H (2010). Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Obstetricia y Ginecología*; 61(3): p.247-255
217. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Ruiz F, Bonilla S, Cabanes C, Tabares L, Martinez S (2006). Adult stem cells therapy. Dream or reality?. *Transpl Immunol*; 17: p.74-77
218. Insausti CL, Blanquer M, Garcia-Hernández AM, Castellanos G, Moraleda JM (2014). Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning*; 7: p.53-63

219. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B et al. 2010. Mesenchymal Stem cells: mechanism of immunomodulation and homing. *Cell Transplantation*; 19: p.667-679
220. Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW (2007). Adipose-derived cells. *Cell Transplant*; 16: p.963-970
221. Kapur SK, Katz AJ (2013). Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*; 95(12): p.2222-2228
222. Wagner W, Bork S, Lepperdinger G, Jousen S, Ma N, Strunk D, Koch C (2010). How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging*; 2:224-230
223. Zhang ZX, Guan LX, Zhang K, Wang S, Cao PC, Wang YH (2007). Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro. *Cell Biol*;31: p.645-648
224. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, MOrretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F (2007). Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro cultured and do not exhibit telomere maintenance mechanism. *Cancer Res*; 67: p.9142-9149
225. Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J, Bunner BA (2008). Long term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res*; 68: p.4229-4238
226. Bochkov NP, Voronina ES, Kosyakova NV, Liehr T, Rzhaininova AA, Kotosova LD, Platonova VI, Gol'dshtein DV (2007). Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Bull Exp Biol Med*; 143: p.122-126
227. Ferrer L, Kimbrel EA, Lam A, Falk EB, Zewe C, Joupperi T, Lanza R, Hoffman A (2016). Treatment of perianal fistulas with human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells: a canine model of human fistulizing Crohn's disease. *Regen Med*; 11(1): p.33-43
228. Wood JA, Chung DJ, Park SA, Zwingenberger AL, Reilly CM, Ly I, Walker NJ, Vernau W, Hayashi K, Wisner ER, Cannon MS, Kass PH, Cherry SR, Borjesson DL, Russell P, Murphy CJ (2012). Periocular and Intra-Articular injection of canine adipose- derived mesenchymal stem cells: an *in vivo* imaging and migration study. *J Ocul Pharmacol Ther*; 28(3): p.307-317

229. Rodbell M (1964). Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormone on fat metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*; 239: p.375-380
230. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer E (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined médium. *J Clin Inves*; 84: p.1663-1670
231. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M (2010). Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant*; 19: p.279-289
232. Binato R, Fernandez TS, Lazzarotto-Silva C, Rocher BD, Mencialha A, Pizzati L, Bouzas LF, Abdelhay E (2013). Stability of human mesenchymal stem cells during *in vitro* culture: considerations for cell therapy. *Cell Prolif*; 46: p.10-22
233. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L (2006). Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human msenchymal stem cells. *Stem Cells*; 24(2): p.315-321
234. Castanheira P, Torquetti L, Nehemy MB, Goues AM (2008). Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injectec in the injured retina of rats. *Arq Bras Oftalmol*; 71: p.644-650
235. Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, Takahashi H, Kondo M, Tamaki Y, Araie M, Yanagi Y (2007). Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res*; 85(2): p.234-241
236. Sgrignoli MR, Silva DA, Nascimento FF, Sgrignoli DAM, Nai GA, Guimaraes da Silva M, Andrade de Barros M, Bittencourt MKW, Pereira de Morais B, Dinallo HR, Foglia BD, Cabrera WB, Fares EC, Andrade SF (2019). Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF in dogs with keratoconjunctivitis sicca trated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*; 39: p.101525
237. Whitney RD, McLaughlin SA (1995). Update on eye disorder among purebred dogs. *Vet Med*: 6: p.575-592
238. Kaswan RL, Salisbury MA (1990). A new perspective on canine keratoconjunctivitis sicca. Treatment with ophthalmic cyclosporine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 20: p.583-613

239. Grauwels MFW. A study of keratoconjunctivitis sicca in the dog. Thesis in University of Glasgow, Inglaterra, 1979
240. Carrington SD, Bedford PGC, Guillon JP, Woodward EG (1987). Polarized light biomicroscopic observations on the pre-corneal tear film. The normal tear film of the dog. *J Small Anim Practice*; 28: p.05-622
241. Blocker T, Van Der Woerd A (2001). A comparison of corneal sensitivity between brachycephalic and domestic short-haired cats. *Vet Ophthalmol*; 4(2): p.127-130
242. Bolzanni H, Oriá AP, Raposo ACS, Sebbag L (2020). Aqueous tear assessment in dogs: Impact of cephalic conformation, inter-test correlations, and test-retest repeatability. *Vet Ophthalmol*. DOI: 10.1111/vop12751
243. Labelle AL, Dresser CB, Hamor RE, Allender MC, Disney JL (2013). Characteristics of, prevalence of, and risk factors for corneal pigmentation (pigmentary keratopathy) in Pugs. *J AM Vet Med Assoc*; 243(5): p.667-674
244. Slatter DH, Lavach JD, Severin GA, Young S (1977). Überreiter's syndrome (chronic superficial keratitis) in dogs in the Rocky Mountain area - a study of 463 cases. *J Small Anim Practice*; 18: p.757-772
245. Carrington SD, Bedford PGC, Guillon JP, Woodward EG (1989). Biomicroscopy of the tear film: the tear film of the Pekingese dog. *Vet Records*; 124: p.323-328
246. Barnett KC (1988). Keratoconjunctivitis sicca: sex incidence. *J Small Anim pract*; 29: p.531-534
247. Damato BE, Allan D, Murray SB (1984). Senile atrophy of the human lacrimal gland, the contribution of chronic inflammatory disease. *Brit J Ophthalmol*; 68: p.674-680
248. Kern TJ (1986). Disorders of the lacrimal gland system. En: Kiek RW 8ED) Current Veterinary Therapy XI. Philadelphia. Saunders. 1986: p.634-641
249. Aguirre GD, Rubin LF, Harvey CE (1971). Keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc*; 29: p.531-534
250. Forre O, Bjerkhoel F, Salvessen CF (1987). An open, controlled, randomised comparison of cyclosporine and azathioprine in the treatment of rheumatoid arthritis: a preliminary report. *Arthritis Rheum*; 30: p.88-92

251. Bell TAG, Easty DL, McCullach KG (1982). A placebo controlled blind trial of cyclosporin A in prevention of corneal graft rejection in rabbits. *Br J Ophthalmol*; 66: p.303-308
252. Zhao JC, Jin XY (1993). Immunological analysis and treatment of Mooren's ulcer with cyclosporine A applied topically. *Corneal*; 12: p.481-488
253. Holland EJ, Chan C, Kuwabara T, Palestine AG, Rowseg IJ, Nussenblatt RB (1989). Immunohistologic findings and results of treatment with cyclosporine in ligneous conjunctivitis. *Am J Ophthalmol*; 107: p.160-166
254. Kaswan RL Salisbury MA, Ward DA (1989). Spontaneous canine keratoconjunctivitis sicca: a useful model for human keratoconjunctivitis sicca: treatment with ciclosporina eye drops. *Arch Ophthalmol*; 107: p.1210-1216
255. Emmel EA, Vermeij CL, Durand DB, Higgins KM, Lacy E, Crabtree GR (1989). Cyclosporine A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cells activation. *Science*; 246: p.1617-1620
256. Lui J (1993). FK 506 and cyclosporine , molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol Today*; 14: p.290-295
257. Williams DL (1997). A comparative approach to topical cyclosporine therapy. *Eye*; 11: p.453-464
258. Herrera HD, Lightowler CH (1994). Retrospective study: Use of the cyclosporine A on the canine KCS in Argentina (1991-1993). ECVO Annual Meeting, Alemania
259. Radziejewski K, Balicki I (2016). Comparative clinical evaluation of tacrolimus and cyclosporine eye drops for the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca. *Acta Vet Hung*; 64(3): p.313-329
260. Sansom J, Barnett KC, Neumann W, Schulte-Neuman A, Clerc B, Jegou JP, Haas V, Weingarten A (1995). Treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs with cyclosporine ophthalmic ointment: a European clinical field trial. *Vet Record*; 137: p.504-505
261. Peters DH, Fitton A, Plosker GL, Faulds (1993). Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drug*; 46: p.746-794
262. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H (1987). FK506, a novel immunosuppressant isolated from a

- Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot*; 40: p.1256-1265
263. Reksten TR, Jonsson MV, Szyszko EA, Brun JG, Jonsson R, Brokstad KA (2009). Cytokine and autoantibody profiling related to histopathological feature in primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol*; 48: p.1102-1106
264. Barabino S, Montaldo E, Solignani F, Valente C, Mingari MC, Rolando M (2010). Immune response in the conjunctival epithelium of patients with dry eye. *Exp Eye Res*; 91: p.524-529
265. Barabino S, Chen Y, Chauhan S, Dana DR (2012). Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Prog Retin Eye Res*; 31: p.271-285
266. Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, Gingerich DA, Harman R (2007). Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther*; 8: p.272-284
267. Vilar JM, Batista M, Morales M, Santana A, Cuervo B, Rubio M, Cugat R, Sopena J, Carrillo JM (2014). Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded forced platform analysis. *BMC Vet Res*; 10: p.143
268. Kim Y, Lee SH, Kim WH, Kweon OK (2016). Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. *J Vet Sci*; 17: p.123-126
269. Conzemius MG, Evans RB (2012). Caregiver placebo effect for dogs with lameness from osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc*; 241: p.1314-1319
270. Hong SJ, Traktuev DO, March KL (2010). Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant*; 15: p.86-91
271. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi S, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M (2007). Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng*; 13: p.2949-2955

Resumen

La queratoconjuntivitis seca es una patología que se observa en el día a día de la clínica de medicina veterinaria, suponiendo un malestar para el animal en el caso de encontrarse en los estadios moderados, graves y severos de la enfermedad; y también para el dueño ya que requiere de un tratamiento diario de por vida. La frecuencia de administración del tratamiento convencional puede llegar a ser un inconveniente en este tipo de enfermedades debido a su alta frecuencia en gotas, por lo que el uso de nuevas terapias abre un horizonte en la posibilidad de actuar como tratamientos adyuvantes. En este estudio se propuso la infusión de células madre mesenquimales en la glándula orbital y de la membrana nictitante y comparar los resultados con la terapia médica convencional.

Previo a ello se creó una escala clínica con 8 variables que se correspondían con los diferentes signos clínicos de la enfermedad. Dichas variables fueron el Test de Schirmer I, descarga ocular, hiperemia conjuntival, edema, pigmento y vascularización corneal, test colorimétrico y valoración de la cámara anterior. Dicha escala permitió un seguimiento y evolución de los pacientes a lo largo del tiempo y clasificarlos en diferentes estadios según su gravedad. Para poder utilizar la escala se seleccionó una población con queratoconjuntivitis seca y se testó la fiabilidad y concordancia de ella mediante tres observadores con diferente formación y experiencia clínica. Los observadores mostraron una fiabilidad y concordancia óptima de la escala, lo que permitió extrapolarla al estudio médico posterior.

El posterior estudio terapéutico tuvo una duración de un año para cada paciente, con controles de seguimiento a los 45 días, 3, 6, 9 y 12 meses, tanto para la terapia médica y celular. La infusión de células madre mesenquimales de origen adiposo solo se realizó una vez, y para ello se procedió a la sedación y mantenimiento con mascarilla de los pacientes y posterior administración de la terapia a nivel de la glándula orbital y de la membrana nictitante de ambos ojos. En estos pacientes se redujo el tratamiento tópico a la mitad, mientras que en el grupo médico se dejó la pauta convencional durante todo el periodo del estudio.

La respuesta a ambos tratamientos fue positiva con la mejoría de los signos clínicos, observándose con la terapia celular una reducción del 44% en la puntuación total a los 3 meses en comparación con un 24% con la terapia médica convencional. Dicha mejoría dio lugar a una estabilidad que se mantuvo hasta los 6 meses, sin

realizar modificaciones en el tratamiento tópico, para luego ir empeorando hasta finalizar el estudio. Por lo que en base a los resultados obtenidos, el tratamiento adyuvante con células madre permite una reducción de la pauta en gotas y una mejoría en los signos clínicos, pero con un punto de inflexión a los 6 meses en el cual se recomendaría volver a inyectar la terapia celular.

Summary

Keratoconjunctivitis sicca is a common disorder in the veterinary medicine and it produces discomfort in the animal when it appears in the moderate, serious and severe stages. For the owners mean a high dedication, because of the conventional treatment frequency that they must apply. These is why the new therapies , such as stem cells, open the horizon to work like adjuvant treatments.

The aim of this study was to infuse mesenchymal stem cells around the orbital and nictitant glands, and compare the results with the conventional topical treatment.

Before to do it, it was created a clinic scale with 8 variables, and they represented the different clinical signs of the disease. The variables were Schirmer tear test I, ocular discharge, conjunctival hyperaemia, corneal edema, pigmentation and vascularization, stain test and testing anterior chamber. The clinic scale allows the follow up of the patients along the time and assess to classify in different stages depending on the severity. To be able to perform the grading scale a population with keratoconjunctivitis siica was selected, which was not subsequently included in the medical study. The fiability and the concordance was tested by three observers with different training and clinical experience. The results showed an optimal fiability and concordance of the clinical scale, what allowed to be used in the subsequent medical study.

The subsequent therapeutic study lasted one year for each patient with follow up at 45 days; 3, 6, 9 and 12 months for the medical and stem cell therapy. The injection of mesenchymal stem cells therapy was done only at the first day, and for doing the procedure around the orbital lacrimal and nictitant glands the animals were sedated and maintained with face mask. In this group, the topical treatment was reduced half, while in the medical no changes along the year was done.

The clinical response with both treatments was positive with a reduction of the clinical signs. In the stem cell group the reduction in the clinical score was 44% at the third month compared with 24% in the medical group. The improvement was stable during 6 months without modification in the treatment, after that, the stem cell group started to be worst until the end of the study.

Based on the results, the adjuvant treatment with stem cells allows to reduce the topical treatment and improves the clinical signs, but with an inflexion point at 6 months, in which it would be recommended to inject again the stem cells therapy.