

01674
27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

DETERMINACION DE LA MICROFLORA BACTERIANA Y
FUNGICA DOMINANTE CONJUNTIVAL Y CORNEAL EN
CONDICIONES NORMALES Y PATOLOGICAS Y SU
ACTIVIDAD PROTEOLITICA *in vitro* EN CABALLOS DE LA
ZONA CENTRO DE LA REPUBLICA MEXICANA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

AYTZEE ELOISA PIÑON CABRERA

TUTOR:

MVZ DC GUSTAVO ADOLFO GARCIA SANCHEZ

COMITE TUTORAL:

MVZ PhD ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES.

MC Ofc. EDNA UGUETTE ANGEL MUÑOZ.

MVZ MSc Alejandro Rodriguez Monterde (Invitado).

México, D. F.

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo vocacional.

NOMBRE: Artzée Elvira
Piñón Cabrera
FECHA: 29.10.03
FIRMA: [Firma]

El caballo posee la belleza sin la vanidad,
la fuerza sin la insolencia,
el valor sin la ferocidad....
Y todas las virtudes del ser humano,
sin sus vicios ni perversiones.
El caballo es, en definitiva,
la mejor y más noble conquista del hombre.

Anónimo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2

DEDICATORIAS:

A MAMI: gracias por ser el pilar de mi vida y la fuerza para lograr lo que me proponga., gracias por haberle dado vida a tus alas....

A PAPI: por ser yo tan importante para ti como lo eres tu para mi, gracias por siempre estar ahí...

A ARTU: por ser hermano y compañero, por esperar tanto de mi y por tantas aventuras que contar..

A MALÚ: por estar siempre dispuesta , gracias por una vida de apoyo y amistad, por tu cariño y dedicación infinitos

A JORGE: gracias por tu esperado y oportuno amor, por tu tolerancia , tu compañía, por hacer realidad mis sueños y mantener viva mi esperanza, te quiero

A BOSTER BROWN: mi motivo de inspiración, gracias por tus ojos, por nuestra comunicación y entendimiento, por toda la alegría de galopar juntos por siempre

A mi CARINA: gracias por tus horas de amor y por hacer mi vida tan feliz con tu sola presencia

A JACK: por darme lo único que posees y que en realidad es lo mejor, tu corazón...

A WUNDER: gracias por la compañía y por siempre estar cerca

A Ginger, Federica, Motor y Gregorio gracias por ser el ejemplo de amor máximo a seguir...

A todos mis pacientes, mis queridos caballos que sirvieron para este proyecto, estoy feliz por los que salve y perdón por los ojos que se han perdido...seguiré trabajando para tener solo éxitos

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Adolfo García. Mi agradecimiento y cariño eternos, por ser tan buen maestro pero sobre todo amigo, gracias una vez mas por dejarme crecer cobijada con su sombra...

Al Dr. Roberto Cervantes: un sabio de la micología, gracias por tanta ayuda y por adentrarme al maravilloso mundo de los hongos con tan buena amistad..

A la Dra. Edna Angel: mi ejemplo a seguir por ser una mujer íntegra y una excelente profesionista, te quiero mucho

Al Dr. Tonatiuh Ramos y al Dr. Diego Ulibarri por su ayuda desinteresada, por acogerme sin conocerme y por haber confiado en mi desde un principio, los quiero

Al Dr. Jaime Navarro por su ayuda en la estadística de este proyecto, gracias por su tiempo, sus pláticas, su orientación y su amistad.

A la Dra. Vanzzini de la Asociación para Evitar la Ceguera por habernos ayudado con la identificación bacteriológica, gracias...

Al Dr. Alejandro Rodríguez por la ayuda prestada para la elaboración de este proyecto

A la QFB Carolina Segundo, gracias Carito por que somos amigas, por que se que cuento contigo y por tantas horas dedicadas para la medición de mis proteínas

A la Fam. González Cabrera por que siempre que los necesito ahí están y porque seguimos juntos

Y sobre todo gracias mi Dios por ser tan maravilloso con migo...

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE:

RESUMEN

I. Introducción

	Página
1.1 Embriología de la conjuntiva	2
1.2 Anatomía de la conjuntiva	2
1.3 Embriología de la córnea	3
1.4 Anatomía de la córnea	4
1.5 Película precorneal	7
1.6 Ulcera corneal	8
1.7 Fisiopatología de la ulceración corneal	9
1.8 Mecanismos de respuesta hacia las úlceras corneales	14
1.9 Signos clínicos de ulceración corneal	19
1.10 Tratamiento	20
1.11 Estructura general de las bacterias	23
1.12 Estructura general de los hongos	24

II. Justificación	26
-------------------	----

III. Hipótesis	27
----------------	----

IV. Objetivos	28
---------------	----

V. Material y métodos	29
-----------------------	----

5.1 Examen diagnóstico oftalmológico	31
5.2 Identificación microbiológica en el laboratorio	34
5.3 Análisis de la actividad proteolítica	38

VI. Resultados	47
----------------	----

VII. Discusión	68
VIII. Conclusiones	72
IX. Figuras	
1) Inervación sensorial de los párpados	73
2) Sitios para bloqueos nerviosos regionales	74
3) Preparación del sistema para el análisis de la actividad proteolítica	75
4) Representaciones de los principales hongos del género Deuteromycotina	76
5) Concentradores de proteínas	77
6) Asociación entre hongos y bacterias y su presencia en muestras tomadas de caballos sanos y enfermos	78
7) Resultados obtenidos de la medición de la actividad proteolítica producida por cada hongo en los diferentes medios	79
X. Cuadros	
1) Cambios bioquímicos y moleculares que ocurren durante la ulceración corneal	81
2) Mecanismos de reparación corneal	82
3) Reseña de las especies de hongos y bacterias aislados de ojos de caballos y de su ambiente	83
4) Resultados de la determinación de proteínas y de la aplicación de la fórmula para medir la actividad específica de la elastasa	84
5) Proporción real entre las proteínas y la actividad proteolítica de la elastasa	102
6) Frecuencias de los casos y presencia de hongos	110
XI Pie de páginas	112
XII Anexo	113
XIII Referencias bibliográficas	115

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

6

RESUMEN.

En el presente trabajo se tomaron 7 muestras de ojos de caballos sanos, 15 de caballos con queratomicosis y 7 de ambiente de los caballos en la zona centro de la República Mexicana. Las muestras se sembraron e identificaron en el laboratorio para determinar la microflora bacteriana normal y comprobar la variación de organismos Gram (+) a Gram (-) por el cambio en las condiciones del ambiente ocular ocasionadas por un daño en la córnea; además de determinar los posibles hongos causantes de queratomicosis con actividad proteolítica mediante su cultivo en tres diferentes medios y usando una prueba colorimétrica con elastina-rojo congo como sustrato y midiendo la actividad enzimática con un espectrofotómetro a 495 nm.

Los resultados obtenidos demuestran 13 géneros micóticos diferentes predominando el *Aspergillus terreus* con mayor número de aislados y una mayor actividad proteolítica, este es el primer informe de este hongo como causante de queratomicosis equina, seguido con altos niveles de producción enzimática por *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*.

La degradación del estroma de la córnea por enzimas proteolíticas es muy rápida y progresiva en caballos por lo que la determinación de la actividad proteolítica de los hongos involucrados en procesos de queratomicosis puede ser un elemento importante para el diagnóstico y tratamiento de la queratomicosis equina.

Palabras clave: caballos, ojos, queratomicosis, hongos

SUMMARY.

In the present study we took 7 samples from healthy horses, 15 from horses with keratomycosis and 7 samples from different environments where horses live in the central zone of Mexico. We cultured the samples for the determination of the normal bacteria in the eye and look for the variation in numbers from Gram (+) organisms to Gram (-) due the changes in the conditions of the ocular environment because a damage in the cornea, besides the determination of fungus that could produce keratomycosis with proteolytic activity by their culture in three different mediums and the use of a colorimetric test with elastin-congo red as the substrate measuring the enzymatic activity with a spectrophotometer at 495 nm.

Our findings showed 13 different fungi from which *Aspergillus terreus* is the one with the higher proteolytic activity, this fungus has never been reported before as a cause of equine keratomycosis, it was followed by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* with high values of enzymatic production as well.

The stromal corneal degradation caused by proteolytic enzymes is faster and progressive in horses, that is why determination of the proteolytic activity of the fungi involved in keratomycosis could be an important element for the diagnosis and treatment of equine keratomycosis.

Key words: horses, eyes, keratomycosis, fungus

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7

DETERMINACIÓN DE LA MICROFLORA BACTERIANA Y FÚNGICA DOMINANTE CONJUNTIVAL Y CORNEAL EN CONDICIONES NORMALES Y PATOLÓGICAS Y SU ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA *in vitro* EN CABALLOS DE LA ZONA CENTRO DE LA REPÚBLICA MEXICANA.

INTRODUCCIÓN.

El método principal por el que la mayoría de los animales se relacionan con su entorno y con los cambios que ocurren en su medio ambiente, es mediante la reflexión o emisión de luz a través de objetos externos y la recepción de esta luz mediante órganos especiales que llamamos fotorreceptores. El fotorreceptor más complejo que se conoce recibe el nombre de ojo. ¹

El ojo u órgano de la visión comprende el globo ocular, el nervio óptico y ciertos órganos asociados al mismo, estos órganos son la fascia orbitaria y músculos, los párpados, la conjuntiva y el aparato lagrimal.

El ojo consta de tres túnicas concéntricas en cuyo interior están encerrados el humor acuoso y el humor vítreo que son medios refringentes; estas túnicas son la túnica nerviosa que es la retina, ésta es una delicada membrana que se extiende desde la entrada del nervio óptico hasta el borde de la ora serrata; la túnica vascular se encuentra por dentro de la túnica fibrosa y comprende a la coroides, al cuerpo ciliar y al iris y la túnica fibrosa es la túnica externa y está compuesta de una parte opaca posterior llamada esclerótica y una parte anterior transparente que es la córnea. ²

El ojo equino está mas predispuesto a queratomycosis y a queratitis ulcerativa en comparación con otras especies animales, esto se debe a la posición lateral de los ojos del caballo, al gran tamaño del globo ocular, al medio ambiente que los rodea, a las prácticas comunes de alimentación que incluyen pastura henificada y a la actividad física violenta que generalmente realizan, además de la presencia de hongos como parte de la flora normal del saco conjuntival. ³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1

EMBRIOLOGÍA DE LA CONJUNTIVA.

La conjuntiva con su epitelio, sustancia propia y células mucosas, por un lado cubre la superficie posterior de los párpados (conjuntiva tarsal) con un epitelio que se adhiere íntimamente al tarso y por otro lado recubre el globo ocular hasta los límites de la córnea. En el ojo descansa sobre tejido mesenquimatoso laxo con vasos sanguíneos. Se deriva del ectodermo de revestimiento. ⁴

ANATOMÍA DE LA CONJUNTIVA.

El aspecto interno de los párpados está delimitado por una membrana mucosa conocida como conjuntiva. La conjuntiva palpebral comienza en el margen del párpado; al nivel del borde orbitario la conjuntiva se dirige hacia el globo y se convierte en conjuntiva bulbar, el punto de unión es el fórnix conjuntival. El saco conjuntival es el espacio creado entre las dos caras de conjuntiva. La conjuntiva está constituida por epitelio estratificado escamoso cerca del margen palpebral y hacia el fórnix se convierte en cuboidal. ⁵

Las células globosas de la conjuntiva son glándulas productoras de mucina y están presentes a través de toda la conjuntiva palpebral hacia el fórnix en forma homogénea. La conjuntiva bulbar es muy delgada y se continúa con el epitelio anterior de la córnea a nivel del limbo. En los caballos la conjuntiva bulbar temporal comienza a verse muy pigmentada cerca del limbo. La conjuntiva es rica en fibrocitos, mastocitos, células plasmáticas, linfocitos y macrófagos. Tiene numerosos nódulos linfáticos y el número de estos varía dependiendo de la edad del animal y de la estimulación antigénica. ⁶

La conjuntiva es una estructura altamente vascularizada y debe de conservarse húmeda constantemente para que se mantenga saludable. Las arterias de la conjuntiva se derivan de las arterias ciliares anteriores que a su vez se originan de la arteria externa oftálmica. Los nódulos linfáticos, con alto número de células mastocíticas, células plasmáticas y macrófagos, predisponen a la conjuntiva a ser altamente sensible a respuestas inmunomediadas. La naturaleza de la conjuntiva le permite presentar los signos clásicos de inflamación: rubor (hiperemia), tumor (quemosis), dolor (blefaroespasma) y calor. ⁵

La conjuntiva es la más expuesta de todas las membranas mucosas. Dentro de sus funciones primarias se encuentran el prevenir

la desecación de la córnea, el aumentar la movilidad de los párpados y el globo y proveer una barrera en contra de los microorganismos y cuerpos extraños, este último papel es importante considerando que en la conjuntiva habitan numerosos microorganismos como parte de la flora normal microbiana, aunque muchos de estos tengan la capacidad de convertirse en patógenos potenciales. ⁷

La flora conjuntival normal está compuesta en su mayoría por organismos Gram positivos correspondientes a los géneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* y *Actinomyces* y con menor frecuencia organismos Gram negativos de los géneros *Serratia*, *Moraxella*, *Pasteurella* y *Pseudomonas* que son bacterias patógenas oportunistas y hongos ambientales como *Aspergillus* y *Penicillium*. Parte de la microflora normal es potencialmente patógena y puede causar enfermedades serias al multiplicarse y complicar la lesión hacia un proceso infeccioso. ⁸

El tejido conjuntival es rico en células con actividad inmunológica y representa una extensión del sistema inmune de mucosas; dentro de la conjuntiva los linfocitos están presentes entre las células epiteliales y en la sustancia propia y como otras membranas mucosas la población de linfocitos intraepiteliales consiste predominantemente en células CD8+ que juegan un papel importante en la regulación de las respuestas inmunes. La sustancia propia de la conjuntiva es también rica en células dendríticas CD1+ y macrófagos. Dado que la conjuntiva tiene una gran cantidad de células inmunes y es rica en suplemento vascular, es capaz de presentar respuestas inflamatorias e inmunológicas agresivas. ⁹

EMBRIOLOGÍA DE LA CÓRNEA.

Embriológicamente, el endotelio y el estroma corneal se derivan de una extensión centripeta de la cresta neural del mesodermo alrededor de la extremidad anterior de la invaginación de la copa óptica, eclosionando la vesícula del lente ectodermal y el mesenquima, los que al atrofiarse forman la cámara anterior. El epitelio corneal se forma por diferenciación y migración de la cara adyacente del ectodermo. ⁴

ANATOMÍA DE LA CÓRNEA.

La córnea del ojo equino es grande comparada con otras especies animales y con forma de elipse horizontal, forma el quinto anterior de la túnica fibrosa del ojo, es transparente y avascular. Constituye una modificación fisiológica estructural de la esclerótica y cuando sufre algún daño crónico, puede perder el carácter especializado y semejar a la esclerótica límbica ya sea oftalmoscópica como histológicamente. Anatómicamente, la córnea equina es más delgada en el vértice y comprende cuatro diferentes capas que terminan en el limbo y se continúan con la conjuntiva bulbar, episclera, esclerótica y con el ángulo iridocorneal. El tamaño del diámetro corneal vertical y horizontalmente en un equino adulto es de 33 mm y 36 mm respectivamente y su grosor es de 1-1.5 mm en la periferia y de 0.8 mm centramente. ¹⁰

Dentro de las funciones de la córnea se encuentran el soporte de los contenidos intraoculares, la refracción de la luz debido a su curvatura y la transmisión de luz mediante su transparencia. La córnea recibe nutrientes y oxígeno del humor acuoso, del filamento lagrimal precorneal y de los capilares perilímbicos y los párpados y la membrana nictitante la protegen del medio externo. ¹¹

La característica más sobresaliente de la córnea es su claridad y la pérdida de la misma constituye el signo más evidente de enfermedad corneal. La claridad es consecuencia de muchos caracteres anatómicos y fisiológicos altamente especializados: un epitelio superficial inusualmente regular, no pigmentado y no queratinizado, un estroma avascular pobre en células compuesto por fibrillas delgadas de colágeno formando ordenadas láminas y un alto grado de deshidratación que se mantiene una bomba Na/K, ATPasa dependiente en la membrana celular del endotelio corneal, esta deshidratación está asegurada pasivamente por medio del epitelio corneal hidrofóbico y por la falta de vasos sanguíneos del estroma. ¹²

A continuación se describe esta conformación histológica de la córnea:

* Epitelio corneal.

La porción anterior de la córnea comprende un epitelio no queratinizado estratificado escamoso que forma una barrera relativamente impermeable para el agua y solutos. Las microvellosidades de las células superficiales de ésta capa añaden adhesión y se dispersan en la capa mucosa de la película lagrimal precorneal con la cual establece íntimo contacto. La membrana

basal es un depósito granular con fibrillas muy finas formadas por proteínas y glicoproteínas. Las células basales se encuentran firmemente unidas a la lámina de la membrana basal mediante hemidesmosomas y fibras de colágeno. El epitelio es ricamente suplementado con terminaciones de nervios sensoriales intraepiteliales no mielinizados derivados de las largas ramas ciliares de la división oftálmica del nervio trigémino. ¹³

* Estroma corneal

El estroma es la parte más gruesa de la córnea, comprende el 80-90% del grosor de la córnea y está compuesto por láminas paralelas de fibras de colágeno rodeadas por una sustancia de proteoglicanos polisulfatados hidrofílicos. Dentro de las láminas, las fibras de colágeno se dirigen en la misma dirección y están orientadas en un patrón regular distribuyéndose por un área que transmite luz y asegurando una transparencia normal; un cambio en el diámetro de las fibras y la separación de la estructura de estas fibras altera el índice de refracción y resulta en opacidad corneal. La composición y el radio de los glicosaminoglicanos que constituyen a la sustancia que se encuentra entre las fibras de colágeno influyen en la distancia entre estas fibras y por lo tanto en la claridad corneal. El colágeno que forma a este estroma es de diferentes tipos; el colágeno tipo I es el más común y forma las fibrillas pequeñas estriadas, el colágeno tipo VI está asociado solo con la matriz interfibrilar formando una red alrededor de las fibras, el colágeno tipo III y XII son importantes durante la reparación corneal. ¹⁴

Las células nucleadas, los queratocitos y los precursores de fibroblastos son distribuidos por toda el área a través del estroma con una gran densidad. Los glicosaminoglicanos varían en su composición pero normalmente incluyen heparan sulfato, queratan sulfato, ácido hialurónico, dermatan sulfato y condroitin sulfato y contribuyen a la hidratación corneal. Las funciones de los glicosaminoglicanos son mediar la comunicación entre células, regular el crecimiento celular, regular la velocidad mitótica de la replicación celular y proveer cualidades adhesivas a las células. ¹⁵

Durante la reparación del estroma corneal, el radio de los diferentes glicosaminoglicanos varía hasta formar grandes macromoléculas que se comprimen en la sustancia y aumentan la distancia entre las fibras de colágeno y por consiguiente disminuye la transparencia corneal.

*** Membrana de Descemet**

Esta membrana limitante posterior es un paquete denso arreglado de fibras de colágeno en una sustancia de glicoproteínas. Esta membrana tiene muchas propiedades de las membranas basales convencionales que incluyen la elasticidad y la resistencia a la hidrólisis enzimática y química. En la periferia se divide en tres series de fibras, las fibras anteriores se unen a la esclerótica, las fibras centrales dan inserción al músculo ciliar y las posteriores pasan al interior del iris formando el ligamento pectíneo del iris. ¹⁶

*** Endotelio corneal**

El endotelio es la capa permeable compuesta de células escamosas hexagonales que se continúa con el ángulo iridocorneal y la cámara anterior y su cara interna está humectada por el humor acuoso. El agua y los solutos atraviesan el endotelio bajo la influencia de gradientes de presión hidrostática y osmótica. Las células endoteliales poseen una bomba de Na-K activada por electrolitos ATP - asa - dependientes los que cuentan con el influjo natural del agua dentro de la córnea y son esenciales para preservar el estroma normal de la relativa deshidratación. ¹⁷

La córnea es avascular, excepto en su periferia, donde las ramas terminales de los vasos de la esclerótica y de la conjuntiva del ojo forman ondas. La sensación corneal es provista por nervios finos no mielinizados que se derivan de los nervios ciliares que a su vez se derivan de la división oftálmica del nervio trigémino y forman un plexo alrededor de la periferia (plexo anular) del que parten algunas fibras al interior de la sustancia propia, se vuelven no medulares y forman el plexo fundamental; de éste parten ramas perforantes que van a la capa limitante anterior y forman un plexo subepitelial que da origen a filamentos que se distribuyen entre las células epiteliales; otras ramas del plexo terminan en la sustancia propia en forma de fibrillas que están en íntima relación con los corpúsculos corneales. Los nervios sensoriales que llegan a la córnea son generalmente receptores de dolor que ayudan a que la córnea se proteja y mantenga su transparencia, por ejemplo, cuando la córnea es tocada por aire o algo choca rápidamente contra ella, un parpadeo rápido junto con la retracción del globo y el prolapso del tercer párpado la protegen, esto se conoce como reflejo palpebral. ¹⁸

PELÍCULA PRECORNEAL.

La córnea cuenta con una película precorneal que la cubre y la provee de nutrientes y se compone de tres capas; su capa externa o superficial está compuesta de una sustancia aceitosa que principalmente es colesterol proveniente de las glándulas de Meibomio y su función es retardar la evaporación y estabilizar la superficie lagrimal.

La capa intermedia se forma por el componente acuoso producido por las glándulas lagrimales orbitaria y nictitante conteniendo alrededor de 70 componentes diferentes como proteínas, sales inorgánicas, glucosa, urea, vitaminas y factores de crecimiento, provee oxígeno, nutrientes y lubricación a la córnea.

La capa interna o profunda está compuesta por una sustancia mucosa (mucina) que es secretada por las células caliciformes de la conjuntiva y une las lágrimas acuosas al epitelio corneal que es hidrófobo. ⁵

Cuando hay cambios en esta película precorneal, la córnea responde con fibrosis y vascularización del estroma, pigmentación del epitelio, mineralización del estroma anterior y de la membrana de Descemet, epidermalización (engrosamiento del epitelio corneal) y por último ulceración. ¹⁹

La córnea en su estado normal es avascular y está protegida por los párpados, lisosomas, inmunoglobulinas secretoras y leucocitos que se encuentran en la película precorneal. La integridad del epitelio corneal es la barrera más importante contra las infecciones oportunistas. Cuando la córnea sufre un trauma directo y se compromete el epitelio corneal, los mecanismos oculares de defensa se ven alterados y prospera una infección fúngal secundaria oportunista; además, cualquier enfermedad ocular que produzca dolor, agitación o frotamiento, predisponen a un daño corneal o infección fúngal secundarios. La relativa sencillez de la anatomía de las células avasculares y de las fibras de colágeno que dan lugar a la transparencia normal de la córnea tiene un papel muy importante en la refracción de la luz del ojo del caballo. ²⁰

ULCERA CORNEAL.

Una úlcera corneal o queratitis ulcerativa es una lesión que involucra un proceso complejo en el cual se ha perdido una cantidad variable de epitelio y de estroma. Al formarse una úlcera corneal, existen diferentes cambios en la córnea, inicialmente ocurre una respuesta a la agresión caracterizada porque después de una hora se aplanan y se deslizan células adyacentes viables hacia las células basales, en las siguientes 24 a 36 horas ocurre mitosis epitelial y en 3 días se forma una nueva membrana basal por previa pérdida epitelial, se forma edema cuando el estroma aumenta su grosor y se produce individualización de las fibras de colágeno, vascularización por la infiltración de vasos del limbo conjuntival que producen queratitis o infiltración de células inflamatorias ocasionando queratomalacia característica en caballos y se define como la licuefacción enzimática rápida y progresiva del estroma corneal mediante colagenolisis mediada por proteasas liberadas por neutrófilos que se infiltran dentro del estroma corneal.²¹

Los factores exógenos y alteraciones en los mecanismos de defensa del huésped sistémicos y locales convierten a la córnea en susceptible a una infección por diversas bacterias, hongos, virus y parásitos. El concepto de microorganismos oculares patógenos y no patógenos se considera como obsoleto y debe de ser reemplazado por la idea firme de que cualquier microorganismo puede invadir a la córnea si se proveen las condiciones óptimas. En la queratitis bacteriana y fúngica las rutas principales de inoculación son un daño en la córnea ocasionado por material extraño contaminado o la invasión mediante un defecto epitelial preexistente.²²

La infección corneal es de curso agudo que puede convertirse en crónico por su rápida evolución que se debe a que las úlceras se contaminan fácilmente por el cambio de flora normal de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus beta hemolítico*, *Corynebacterium sp* y *Bacillus cereus* a bacterias Gram negativas que son patógenas oportunistas potenciales y crecen porque el medio cambia y favorece sus condiciones como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp*, *Escherichia coli*, *Pasteurella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia sp*, *Streptomyces sp*, *Proteus sp*, *Moraxella sp* y *Enterobacter sp*, además de la asociación frecuente con hongos que son flora normal del saco conjuntival del ojo equino (*Aspergillus sp*, *Fusarium sp*, *Mucor sp*, *Cladosporium sp*, *Cryptococcus sp*, *Absidia sp*, *Rhizopus sp*, *Penicillium sp*, *Cylindrocarpon destructans* y *Candida albicans* en potros).⁸

La queratitis bacteriana se caracteriza por dolor agudo, ulceración del epitelio y del estroma corneal, descarga mucopurulenta conjuntival, iritis y supuración del estroma. La queratitis fungal es causada principalmente por hongos saprofitos oportunistas filamentosos y por levaduras y con mayor frecuencia posterior a una terapia esteroidea; se caracteriza por ulceración con infiltrados en el estroma corneal, supuración multifocal e iritis.²³

FISIOPATOLOGÍA DE LA ULCERACIÓN CORNEAL.

La reacción de la córnea a la agresión está notablemente influida por sus caracteres anatómicos y fisiológicos, la córnea dañada no puede responder con una inflamación aguda debido a la ausencia de vasos sanguíneos. Las lesiones y cambios patológicos que involucran al estroma corneal al formarse una úlcera corneal por orden de aparición son:

- Edema que es el signo principal en una lesión corneal inicial, puede ser consecuencia de la lesión del epitelio o endotelio corneal, si el defecto es focal el edema resultante se limita al estroma adyacente al defecto. Se da por pérdida del epitelio corneal ocasionando aumento del flujo en el estroma corneal causando separación de las fibras de colágeno y por cambios epiteliales hidrofílicos dentro del estroma a partir del limbo inflamado o de vasos corneales causando disfunción endotelial. La córnea edematosa se ve opaca y puede estar engrosada cinco veces más de lo normal, la filtración de fluido del estroma hacia el epitelio causa el edema intercelular conocido como queratopatía vesicular.²⁴
- Vascularización en respuesta a una lesión grave es inducida por prostaglandinas, aminas vasoactivas y factores epiteliales angiogénicos; causada por una disminución en la concentración de factores anti-angiogénicos y un aumento en la concentración de factores angiogénicos o por una pérdida del estroma corneal causada por edema. Los angioblastos comienzan a migrar de las venas del limbo corneal 24 horas después del daño a la córnea, moviéndose aproximadamente 1 mm por día.²⁵
- Queratitis o infiltración de células inflamatorias a la córnea; los neutrófilos migran dentro de las áreas de lesión corneal y la infiltración puede ser superficial o profunda, después del daño los macrófagos de los vasos limbiales y de las células del estroma

aparecen en el sitio de la lesión y fagocitan las bacterias, neutrófilos muertos y tejido corneal dañado. El exudado celular inflamatorio contiene linfocitos y células plasmáticas, por lo que la queratitis se acompaña de dolor, fotofobia, epífora y blefaroespasma. En caballos la queratitis más común es la micótica que se caracteriza por abscesos profundos del estroma corneal que llegan hasta la membrana de Descemet, la inflamación ocurre primariamente en la córnea extendiéndose hacia el limbo ocasionando uveítis y endoftalmitis. ^{22,11}

- Pigmentación subepitelial localizada derivada de la infiltración de melanocitos conjuntivales y deposición de melanina que acompaña a la vasculogénesis y puede ser una cicatriz permanente previa de enfermedad corneal. ²⁵
- Fibrosis que ocurre principalmente por vascularización prolongada y ocurre para tratar de remodelar al estroma. Las heridas grandes y abiertas se rellenan con epitelio proliferativo y tejido fibroso del estroma que pueden hacer protrusión a través del defecto de la membrana de Descemet y el endotelio dentro de la cámara anterior. Los fibroblastos que derivan de los queratocitos tienden a crecer a través de la superficie posterior de la membrana de Descemet, el endotelio regenerativo queda entonces separado de los restos de la membrana original de Descemet por una capa fibrosa densa llamada membrana retrocraneal.
- Mineralización por deposición de calcio a través de la membrana basal del epitelio corneal. ²³
- Degradación y reabsorción del colágeno del estroma. En la córnea, el colágeno se encuentra en fibras bien organizadas; cuando la colagenasa es liberada por las células epiteliales después de una lesión en el epitelio, se inicia la digestión del colágeno que forma al estroma y la formación de productos que vuelven a la córnea más susceptible a las catepsinas y otras proteasas. La elastasa neutrófila es la proteasa sérica más abundante en las lágrimas y es un producto de los leucocitos polimorfonucleares, tiene actividad en contra del colágeno tipo III y IV así como de los componentes de la matriz extracelular del estroma corneal como la fibronectina y el heparan sulfato. ²⁰

Un gran número de factores determinan la queratopatogenicidad de cada microorganismo en particular, estos incluyen:

- a) Localización del patógeno en la cara externa del ojo, esto resulta por tratamiento con antibióticos inapropiados desbalanceando la población de flora normal residente y aumentando las especies más patógenas.
- b) Adherencia corneal que requiere de la exposición de sitios receptores en el epitelio basal y el estroma anterior, generalmente es el resultado de un trauma penetrante.
- c) La respuesta inmunológica de la córnea a la enfermedad, las células epiteliales participan en esta respuesta inmune produciendo y secretando citoquinas mediante las células epiteliales infectadas, produciendo también migración de neutrófilos. El nivel de células inmunes en la córnea disminuye a nivel del limbo, las células dendríticas y los macrófagos se extienden dentro de la córnea periférica pero la córnea central está esencialmente desprovista de células inmunes incluyendo los linfocitos T y B. Esta ausencia de células inmunes intrínsecas así como la ausencia de suplemento sanguíneo resulta en que la córnea tenga disminución de las respuestas inmunes.²⁷
- d) Los mecanismos de patogenicidad de los hongos y las bacterias para tener la facilidad de penetrar y diseminarse a través de la córnea, a pesar de la inherente defensa antimicrobiana de los mecanismos externos del ojo.²¹

Independientemente de la estrategia exacta empleada por cualquier patógeno, éstos requieren del acceso a tejidos profundos del huésped penetrando tejidos más superficiales, los cuales en la mayoría de los casos consisten en el epitelio, el cual es la primer barrera que se cruza para la colonización e invasión a tejidos más profundos.²⁶

La naturaleza avascular de la córnea y la ausencia de vasos linfáticos y linfocitos corneales retardan la respuesta inmunológica contra los agentes infecciosos corneales, aunque se piensa que los antígenos microbianos solubles se difunden a través del limbo hacia el sistema linfático y pueden entrar a la sangre por medio de vasos perilimbales o se difunden a través del humor acuoso. Los fragmentos de colágeno, liberados desde el estroma corneal, también se difunden hacia el limbo e influyen en la migración de neutrófilos hacia la córnea; estos neutrófilos liberan enzimas degradativas dentro del estroma causando degeneración de colágeno y estimulando a la migración de más neutrófilos. Las toxinas microbianas, los metabolitos de leucocitos

y la irritación de los nervios sensoriales corneales derivan en iridociclitis secundaria causando un dolor severo y pudiendo resultar como secuela una ceguera permanente. ⁹

El proceso de adherencia bacteriana a la córnea generalmente envuelve una interacción química y estructural entre los componentes de la pared celular bacteriana en donde existe adhesina y un receptor de las células epiteliales o alguna otra estructura en donde la bacteria pueda adherirse. Substancias pegajosas como el glycocalix, las fibronectinas, las lectinas y las exotoxinas de la cara externa de las bacterias pueden tener adherencia inmediata con las células epiteliales de la córnea. Los ácidos teicoicos que son componentes esenciales de la pared celular bacteriana de Gram positivas son los responsables de la adherencia de estafilococos y estreptococos a las células epiteliales corneales. ¹⁰

Las bacterias Gram negativas y en especial *Pseudomonas sp.* tienen en la pared celular filamentos con extensiones que terminan en fimbrias, las que interactúan y se fusionan con las células de la pared epitelial corneal causando adherencia y excavaciones. Dentro de la sustancia propia y de las células del epitelio corneal desaparece *Pseudomonas sp.* siendo resistente a las defensas del huésped y a los efectos de antibióticos tópicos, además de que el proceso entero de adherencia y de penetración al estroma ocurre en tan solo una hora y una vez que esta alcanza el estroma, se replica de forma radial y profunda migrando entre las láminas de colágeno del estroma, facilitándose la producción bacteriana por proteasas séricas, matriz de metaloproteínas, elastasas y proteasas alcalinas que se encuentran en las lágrimas y aumentan su cantidad en caballos con úlceras. Esta invasión corneal es seguida rápidamente de la infiltración del estroma corneal por polimorfonucleares (PMN) que son atraídos quimiotácticamente a la córnea desde los vasos sanguíneos del limbo y de la película precorneal lagrimal. ²²

Después de que entran los PMN a la córnea ocurre un proceso destructivo que incluye la necrosis de los queratocitos del estroma corneal y su fagocitosis. Los PMN migran periféricamente en el estroma corneal anterior, la membrana epitelial basal es destruida, ocurriendo una pérdida de colágeno que se acompaña por la degranulación de los PMN aumentando la destrucción del estroma por la liberación de enzimas proteolíticas de la bacteria y la secreción de colagenasa por los PMN. ²⁴

La transparencia normal de la córnea es dependiente del mantenimiento de la relativa deshidratación del estroma con el ambiente acuoso de la película lagrimal preocular y el humor acuoso.

La integridad física y funcional de las barreras epiteliales y endoteliales determinan los niveles de hidratación de la córnea; el edema se caracteriza por turgencia y opacidad seguido del rompimiento de estas barreras. El edema es el resultado de la pérdida epitelial localizada en el área inmediata del defecto y se resuelve rápidamente mediante formación de nuevo epitelio. De cualquier forma, los daños extensos a las células endoteliales pueden causar una notable y permanente pérdida de la transparencia.²⁵

La curación de un pequeño defecto epitelial puede resultar en el agrupamiento de organismos en el estroma y causar una queratitis intersticial profunda y severa. Los hongos y las bacterias se encapsulan en el estroma corneal después de la re-epitelización de la úlcera corneal sobre el sitio de la infección. Mediante cortes histológicos, se ha comprobado que los hongos junto con neutrófilos líticos tienen afinidad por la membrana de Descemet, en donde frecuentemente se han encontrado hifas, ocasionando lisis multifocal de la membrana de Descemet, lesión raramente encontrada en cualquier otra enfermedad ocular.¹⁰

En ambos casos de ulceración corneal, tanto superficial como profunda, ocurre vascularización, uveítis y dolor intenso. La iritis secundaria se debe al reflejo del dolor y a toxinas bacterianas (endo y exotoxinas) que atraviesan el estroma hidrosoluble hasta alcanzar el humor acuoso y alterar la permeabilidad de la vasculatura del iris ocasionando uveítis anterior iniciada por la liberación de productos celulares tóxicos o por la inducción de complejos antígeno-anticuerpo tóxicos producidos por la queratitis bacteriana y su intensidad puede aumentar al iniciarse la muerte de hifas cuando comienza la terapia antifungal. Esta uveítis es mediada por reflejos que se originan en los nervios sensoriales corneales, el reflejo oculopupilar ocurre como resultado de la estimulación de la rama oftálmica del quinto par craneal por una subsiguiente estimulación del esfínter del iris y del músculo ciliar. El reflejo axonal estimula el paso de impulsos a través del nervio trigémino causando vasodilatación de los capilares del iris, alterando la permeabilidad y produciendo la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares. El reflejo oculopupilar produce miosis y dolor ocular, este fenómeno, en asociación con los bioproductos tóxicos originados de la replicación de organismos durante la licuefacción corneal, resultan en el rompimiento de la barrera que existe entre la

sangre y el ojo, reconociéndose clínicamente por la presencia de proteínas en el humor acuoso conocida como "flama acuosa".

Cuando las infecciones corneales se vuelven muy severas y producen la suficiente estimulación quimiotáctica causan la acumulación de células inflamatorias dentro de la cámara anterior, lo que se conoce como hipopión. El rompimiento del colágeno corneal aparece como una opacidad gris gelatinosa marginal o en el centro de la región de la úlcera. ²⁸

Anexo Cuadro 1.

MECANISMOS DE RESPUESTA HACIA LAS ÚLCERAS CORNEALES

Cada capa de la córnea tiene un potencial de respuesta al daño individual e independiente, este rango y la eficiencia dependen de un gran número de factores que incluyen la localización y profundidad de la úlcera, la presencia de bacterias o de cuerpos extraños contaminantes y la aplicación errónea de antibióticos y corticoesteroides tópicos. ¹⁷

Debido a la naturaleza avascular de la córnea, su proceso de curación es único, al producirse una ulceración corneal, las células epiteliales que se encuentran en el margen de la lesión pierden sus microvellosidades y sus uniones desmosomales deslizándose dentro del defecto corneal. Los leucocitos polimorfonucleares llegan a la córnea dañada a través de la película lagrimal y la mitosis de estas nuevas células intenta restaurar el grosor epitelial en aproximadamente 5 a 7 días. El proceso de curación del estroma es mucho más lento y complejo pues las células del estroma no son capaces de regenerarse por lo que deben de ser reemplazadas por tejido. Clínicamente, el proceso de curación del estroma en caballos ocurre en aproximadamente 13.5 días y la claridad corneal normal es raramente restaurada por completo. ²⁹

La curación de un defecto corneal envuelve una interacción compleja de tejidos con células inflamatorias y está modulado por citoquinas específicas que incluyen al factor de crecimiento epidermal, a la interleucina 1 y factores de crecimiento para fibroblastos. En adición, las células inflamatorias juegan un papel integral en el proceso de curación normal corneal, pues existe un infiltrado central corneal de neutrófilos pocos minutos después de ocurrido el daño a la córnea y los macrófagos se detectan en las fases tardías de curación. La ruta

primaria por la cual estas células alcanzan el sitio de la herida es por vía de la película lagrimal precorneal y la actividad de estas células está regulada por una interacción compleja de citoquinas que incluyen a las ya mencionadas y al factor estimulador de la colonización de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Los productos secretados extracelularmente por los macrófagos regulan la síntesis de colágeno y la angiogénesis en la córnea. ³⁰

Las abrasiones epiteliales responden rápidamente a la aplicación tópica de corticoesteroides y de antiinflamatorios no esteroidales (AINES) locales para la formación de nuevo epitelio. Los corticoesteroides tópicos a bajas dosis producen reparación fibroblástica y suprimen la vascularización y melanogénesis limitando la fibrosis. A pesar de que los corticoesteroides suprimen la actividad granulocítica local y limitan el daño en la córnea, se cree que potencializan los efectos de las proteasas lisosomales en el estroma y su uso para controlar la fibrosis del estroma es convencionalmente pospuesto hasta que se haya completado la formación de nuevo epitelio. ³¹

El epitelio corneal normal de un equino está constituido por 8 a 10 capas de células epiteliales de espesor, pero este aumenta a 10 ó 15 capas de células por hipertrofia del epitelio basal después de un daño en la córnea. La membrana epitelial basal no está completamente formada hasta 6 semanas después de la lesión en el caballo a pesar de que el epitelio cubra el sitio de la úlcera completamente. Se ha comprobado que el tiempo de curación de una úlcera de aproximadamente 7 mm de diámetro con profundidad media en el estroma es de cerca de 12 días en lesiones no infectadas. ³²

El medio ambiente que rodea a la conjuntiva palpebral y a la córnea del caballo está constantemente expuesto a hongos y bacterias. El epitelio corneal equino es una barrera formidable contra la invasión de las bacterias y de los hongos; a pesar de esto cualquier defecto en el epitelio corneal permite la adherencia a la córnea de bacterias y hongos para iniciar una infección. Los mecanismos de defensa de la córnea incluyen las pestañas, el efecto mecánico de lavado de las lágrimas y la película lagrimal además de la cubierta de la córnea de moco ocular y sustancias antimicrobianas como la lisosima, lactoferrina, betalisisina y los anticuerpos e inmunoglobulinas tipo A de las lágrimas. ³³

El actual proceso de curación corneal se compone de células epiteliales en las orillas de la lesión que pierden sus microvellosidades y uniones desmosomales y comienzan a deslizarse dentro del defecto corneal. Cuando el defecto corneal se cierra, cesa la migración celular

y llegan nuevas células epiteliales escamosas que asumen la configuración y función de células basales y al proliferar forman un nuevo epitelio. Las células del estroma no se regeneran sino que son reemplazadas por una combinación de células que migran hacia la zona del daño desde el epitelio y el endotelio corneal y se transforman en células del estroma en un periodo aproximado de 6 semanas. ³⁴

La fijación del epitelio al estroma subyacente permanece lábil durante varias semanas hasta que se forman nuevamente las uniones hemidesmosómicas entre el epitelio y la lámina basal, durante este lapso las células se adhieren a una mezcla de fibrina y fibronectina derivada de los vasos conjuntivales inflamados a través de la película rota. ¹¹

La respuesta del estroma a un daño ocurre por pasos; después del edema local inicial del estroma, un aumento marcado local de la actividad hidrolítica ocurre por enzimas lisosomales, incluyendo proteasas neutrales y glicosidasas que se movilizan dentro del estroma dañado por fagocitos secuestradores y células epiteliales. Estas hidrolasas integran la respuesta normal y actúan lisando y facilitando la fagocitosis de detritus del estroma, su actividad es limitada por inhibidores derivados de las lágrimas. De cualquier manera, la córnea del caballo es extremadamente sensitiva a hidrolasas celulares endógenas y a colagenasas bacteriales exógenas, resultando la formación de ulceraciones corneales simples, frecuentes y rápidas que se pueden convertir en lesiones del estroma destructivas y extensas. En las infecciones del estroma los neutrófilos que aparecen primero provienen de la película lagrimal y de la vasculatura limbal atraídos por las proteasas liberadas por el epitelio dañado, migran hacia adentro del estroma y controlan la contaminación bacteriana, degradan el colágeno dañado y estimulan la fibroplasia y la vascularización. Después aparecen la fibrina y los queratocitos que son las células viables del estroma. ³⁵

Durante la fase inicial de reparación, la restauración inicia con la aparición de fibroblastos corneales en el sitio de la herida; comienza la reparación por medio de colágeno en un patrón irregular y después de 6 a 8 semanas una configuración típica devuelve la transparencia en diferentes grados; la maduración de este colágeno reparador continúa hasta 1 o 2 años después. Cuando el daño corneal es muy grande y se extiende hasta el estroma, el colágeno reparador tiene un patrón muy denso y profundo resultando fibrosis del estroma y opacidad corneal permanente. ³⁶

El daño corneal y su reparación comúnmente se acompañan de la aparición de nuevos vasos sanguíneos provenientes del limbo. El estímulo para la neovascularización se desconoce, pero incluye cambios locales bioquímicos y pérdida de la arquitectura corneal compacta normal. La distribución y configuración de estos vasos son determinadas en parte por la profundidad y la extensión de la herida original, estos pequeños vasos ayudan al acercamiento de fibrina, proteína y células epiteliales que migran a través de la lesión del estroma para proveer nutrientes adicionales y células de reparación a través del estroma infectado.

En caballos con infecciones del estroma, la neovascularización proveniente del limbo avanza aproximadamente 1 mm por día. Los vasos superficiales aparecen como ramas individuales en el epitelio del estroma anterior; los vasos del estroma profundo son cortos y forman un borde circumcorneal y los vasos del estroma y de la membrana de Descemet aparecen como vasos aislados. Los queratocitos reactivos y fibroblastos actúan en el sitio de la infección para producir colágeno y nuevos glicosaminoglicanos. Inicialmente el arreglo de las fibras de colágeno y su tamaño varía en comparación a los de una córnea sana, en adición, la nueva matriz formada tiene un radio anormal, lo que evita una perfecta distancia entre las fibras de colágeno para asegurar una transparencia corneal. ³⁷

Anexo Cuadro 2

Si las úlceras no son tratadas pueden llegar a destruir toda la córnea por medio de colagenolisis y actividad enzimática en tan solo 24 horas, esta degeneración rápida del estroma está mediada por actividad proteolítica de proteinasas endógenas y exógenas. ²¹

En procesos patológicos como distrofias, degeneraciones y ulceraciones corneales, los niveles excesivos de ciertas enzimas proteolíticas llamadas proteinasas ocasionan una rápida degradación de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular lo que se conoce clínicamente como queratomalacia o licuefacción corneal. ²⁸

Se han hipotetizado diferentes teorías sobre la actividad proteolítica endógena en la córnea, en estas se incluye la destrucción del colágeno en el estroma corneal y de los componentes de la matriz extracelular, quimiotaxis de leucocitos y su activación durante diferentes estadios de inflamación, destrucción patógena seguida de infección corneal, migración epitelial corneal después de la ulceración corneal y angiogénesis corneal. ³⁸

El daño localizado y la respuesta inflamatoria causada por las proteinasas contribuyen a comprometer al huésped y auxilian en la diseminación de la bacteria. Existen dos familias de proteinasas que afectan a la córnea equina:

- 1) Metaloproteinasa (MMP).- son una familia de enzimas dependientes del zinc y comprende a las colagenasas, estromalinas y gelatinasas, dentro de estas gelatinasas se encuentran la MMP2 que es secretada por fibroblastos del estroma y la MMP9 que es secretada por células epiteliales de la córnea y por leucocitos polimorfonucleares (PMN).
- 2) Proteinasa sérica.- la elastasa neutrófila es la proteína sérica más abundante de las lágrimas y es producto de leucocitos polimorfonucleares, demuestra actividad en contra del colágeno y de componentes de la matriz extracelular del estroma corneal como la fibronectina y el heparan sulfato.

Estas enzimas endógenas existen normalmente en equilibrio con inhibidores de proteinasas endógenas como la α -1-tripsina y la α -2-macroglobulina. Cuando en la córnea existe queratitis ulcerativa, estas antiproteasas endógenas previenen la excesiva degradación tisular y en las úlceras con degradación corneal, la actividad proteolítica ocasiona la destrucción rápida del estroma y la progresión de la úlcera corneal.

Existen además hongos y bacterias que producen estas enzimas proteolíticas (colagenasa y elastasa) de manera exógena y de esta forma contribuyen a la degradación del colágeno que forma el estroma corneal.³¹

Los hongos patógenos inducen la aparición de células epiteliales, fibroblastos corneales del estroma y leucocitos (PMN) en la película precorneal y la sobre estimulación del factor de necrosis tumoral (TNF) que induce la formación de interleucinas citoquinas (Il-1, Il-6 e Il-8) que inducen la producción de metaloproteinasa y de elastasa neutrófila aumentando el proceso inflamatorio.

Aunque un problema oftálmico al principio no imposibilita tanto a los caballos como una claudicación, los casos clínicos de úlceras corneales y queratomicosis en los caballos deben de considerarse como urgencias para intentar preservar la visión debido a que se complican fácilmente porque la mayoría de las úlceras corneales se infectan rápidamente y cicatrizan muy lentamente, lo cual está directamente relacionado con el cambio de micro ambiente ocular que ocasiona el

cambio de flora de bacterias Gram positivas que son flora normal a bacterias Gram negativas que son patógenas oportunistas y a la contaminación con hongos de la flora normal conjuntival.

En caballos una úlcera corneal es una enfermedad dolorosa e indeseable cuyos resultados se traducen en una considerable pérdida económica para el dueño por lo costoso del tratamiento, la pérdida de la función zootécnica del caballo durante el tiempo que dure el tratamiento que generalmente es largo y por la reducción del valor de los animales afectados, sobre todo si hubo pérdida de la visión. ²²

SIGNOS CLÍNICOS DE ULCERACIÓN CORNEAL:

Los signos clínicos de ulceración corneal o queratitis ulcerativa en equinos incluyen queratitis resistente a antibióticos a largo plazo, fibrina en cámara anterior, opacidades focales en forma de nube en el margen de avance de la lesión, ulceración o abscedación corneal con uveítis, puede existir hipopión en cámara anterior, opacidades estriadas en el estroma corneal adyacente a la lesión principal, la cual puede ser edematosa y opaca, además de dolor ocular agudo manifestado por blefaroespasma, miosis, congestión conjuntival, fotofobia, epífora serosa que se convierte en mucosa o mucopurulenta con el tiempo y neovascularización. Puede existir también vascularización que es generalmente un indicador de cronicidad o de sepsis. ^{23,34}

Cuando las úlceras corneales se encuentran contaminadas con hongos, los bordes de las úlceras tienen una apariencia rugosa debida a infiltrados leucocitarios. Conforme proliferan hacia el estroma corneal los filamentos fúngicos, se observan lesiones dentro o alrededor de las úlceras caracterizadas por placas de exudado multifocal seco de tonalidad blanca grisácea lo que indica que existe edema a nivel del estroma, además se observa vascularización corneal profunda. En respuesta a esta gran estimulación quimiotáctica, las células inflamatorias se acumulan en la córnea adyacentes al sitio de la úlcera contribuyendo a la opacidad corneal. ^{24,27}

En todos los casos de ulceración corneal existe iritis secundaria que se debe al reflejo del dolor y a toxinas bacterianas (endo y exotoxinas) que atraviesan el estroma hidrosoluble hasta alcanzar el humor acuoso y alterar la permeabilidad de la vasculatura del iris produciendo uveítis anterior. Esta uveítis es mediada por reflejos que se originan en los nervios sensoriales corneales, el reflejo oculopupilar ocurre como resultado de la estimulación de la rama oftálmica del quinto par craneal por una subsiguiente estimulación del esfínter del iris y del músculo ciliar. El reflejo axonal estimula el paso de impulsos a través del nervio trigémino causando vasodilatación de los capilares del iris, alterando la permeabilidad y produciendo la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares. El reflejo pupilar produce miosis y dolor ocular que en asociación con los bioproductos tóxicos ocasiona la filtración de proteínas al humor acuoso.²⁶

TRATAMIENTO.

En caballos los tratamientos contra las úlceras corneales se dificultan mucho debido al manejo, mano de obra, tiempo y supervisión constante, además de las úlceras en los equinos profundizan mucho en el estroma y por lo tanto son procesos que necesitan medicamentos durante largo tiempo y con mucha frecuencia durante el día, sin olvidar que como son patologías muy dolorosas no es fácil que los animales se dejen medicar durante largos periodos de tiempo.³⁹

El tratamiento recomendado par las úlceras corneales en caballos por orden de importancia es el siguiente:

- Determinar la etiología y eliminar la causa específica
- Determinar la asociación de agentes infecciosos mediante citología y cultivo mediante raspados corneales
- Terapia contra el involucramiento bacteriano secundario con aminoglicosidos, macrólidos o quinolonas.⁴⁰
- Tratamiento tópico frecuente con antimicóticos específicos como los imidazoles
- Antiinflamatorios no esteroidales (AINES) tópicos para inhibir la síntesis de prostaglandinas que forman parte esencial en la

producción de la inflamación y el dolor, los AINES actúan reduciendo la formación de metabolitos de prostanoides (tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas) a partir del ácido araquidónico. ⁴¹

- Prevenir la progresión administrando sulfato de atropina al 1% tópica para eliminar el espasmo ciliar y el dolor debido a la uveítis anterior secundaria y para evitar la formación de sinequias ocasionadas por la pupila miótica. El sulfato de atropina es un anticolinérgico que bloquea las respuestas del músculo esfínter del iris y del músculo de la acomodación del cuerpo ciliar a la estimulación colinérgica, produciendo dilatación pupilar y parálisis de la acomodación, los efectos benéficos de la midriasis consisten en que al dilatarse el iris se ayuda a preservar la apertura de la pupila pues se restringe físicamente la circulación del mismo, disminuyendo el fluido celular y proteináceo que se deriva de los vasos inflamados. La atropina produce una midriasis máxima en 30-40 minutos y tiene un efecto residual de 7 a 12 días, es rápidamente absorbida a través de la conjuntiva y se distribuye por todos los tejidos intraoculares y a través de todo el organismo, es hidrolizada en hígado y excretada por la orina. Se recomienda vigilar de cerca al paciente durante su administración debido a que disminuye la motilidad intestinal y gástrica al bloquear la estimulación parasimpática del músculo liso de la pared gástrica y bloquear la estimulación de la secreción de ácidos gástricos en la fase cefálica y gástrica disminuyendo el vaciamiento gástrico y produciendo distensión abdominal junto con hipotonía y obstrucción gástrica, predisponiendo así a los equinos a síndrome abdominal agudo. ⁴²
- Suero autólogo o inhibidores de la colagenolisis y de proteasas en úlceras infectadas o crónicas. Las colagenasas son enzimas proteolíticas liberadas de lisosomas celulares de varios tejidos incluyendo el epitelio corneal, células del estroma y leucocitos, en la córnea las colagenasas tienen un efecto destructivo en las células del estroma y contribuyen a la ulceración progresiva y a la perforación corneal, la actividad anticolagenasa del suero autólogo consiste en quelar los cationes de calcio que son esenciales para la activación de estas enzimas. ⁴³
- Antiinflamatorios no esteroideos sistémicos (meclumina de flunixin) que son inhibidores de prostaglandinas actuando al aliviar el dolor ocular y controlando los signos de uveítis al

reducir la síntesis de prostaglandinas en la úvea ocasionando vasodilatación y permeabilidad de la vasculatura uveal. ⁴⁴

Para los medicamentos oftálmicos la duración total de la terapia es de aproximadamente entre 6 y 8 semanas dependiendo de la severidad de la lesión y de la respuesta del ojo de cada paciente.

Un manejo exitoso requiere de un diagnóstico temprano específico, de la aplicación de las técnicas adecuadas de diagnóstico y de un tratamiento exacto enfocado al control de la causa y del grado de progresión de la ulceración corneal, este tratamiento debe de ser aplicado en una forma continua y prolongada que garantice resultados favorables.

El tratamiento elegido contra la ulceración corneal debe instilarse dentro del saco conjuntival ventral de forma frecuente y prolongadamente, lo cual se dificulta mucho en los caballos con dolor ocular, por lo que se recomienda la aplicación de un catéter subpalpebral para facilitar y asegurar la mediación al reducir la manipulación directa al ojo y proveer una administración del medicamento sin lastimar el globo ocular. ⁴⁵

ESTRUCTURA GENERAL DE LAS BACTERIAS.

Son organismos con la capacidad de causar enfermedad cuando se encuentran con un huésped en particular, expresando mecanismos de adherencia como pilis, flagelos, fimbrias, filamentos de actina, cápsulas o mediante la producción de enzimas y endo o exotoxinas dependiendo de las condiciones que encuentren para sobrevivir, multiplicarse y diseminarse.

Para su identificación morfológica en el laboratorio las bacterias se dividen en dos grupos de acuerdo a los diferentes componentes de su pared celular que las hace retener o no cierto colorante utilizado en la técnica que ideó el médico danés Hans Joachim Gram.⁴⁶

Las bacterias están compuestas por una pared celular, membrana externa (rica en endotoxinas en el caso de Gram negativas) con un componente lipídico y un polisacárido, un compartimiento intermedio con proteínas, lipoproteínas y una capa de proteoglicanos y una membrana interna citoplasmática, además sus células pueden presentar receptores que secretan polisacáridos o proteínas que las ayudan a unirse a la cara externa del huésped y subsecuentemente se internalizan en éste activando determinadas células del huésped y les instan a que segreguen moléculas que hacen el papel de mediadores que actúan localmente o viajan por la sangre desencadenando repuestas de los macrófagos.

Las bacterias se pueden mover y viajar en superficies sólidas, gaseosas o líquidas para alcanzar al huésped y convertirse en patógenas al causar enfermedad, primero deben de entrar al huésped invadiendo mucosas y membranas, multiplicarse dentro de sus tejidos, no estimular las defensas o interferir con las defensas humorales y producir daño; los mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden causar enfermedad se conocen como mecanismos de patogenicidad y dependen de las características fenotípicas y genotípicas que posea cada género bacteriano en particular.⁴⁷

ESTRUCTURA GENERAL DE LOS HONGOS.

Los hongos son organismos eucariotes, filamentosos que se componen de una hifa que es un filamento individual formado de quitina principalmente y consiste en una pared rígida que contiene protoplasma, en esta hifa algunas especies de hongos tienen intervalos conocidos como septas. Algunos de los compartimentos de las hifas contienen lípidos que desarrollan una pared secundaria gruesa, estas se conocen como clamidoconidias. La pared actúa como una interfase entre el hongo y su medio ambiente, protege a la célula de la lisis osmótica y de los metabolitos de otros organismos, además es el sitio de liberación de algunas enzimas y tienen propiedades antigénicas. La producción de ramas requiere la producción de un nuevo ápice de la pared de la hifa madura existente y la fase primaria se ve como una acumulación de vesículas en el nuevo ápice que se desarrolla. Las hifas se dividen en intervalos regulares mediante partición cruzada llamados septos que tienen uno o más poros pequeños que permiten la comunicación citoplasmática. Las conidias son formadas por colonias vegetativas en crecimiento, algunas conidias forman células especializadas conocidas como fialides que son las últimas células que salen del conidióforo.⁴⁸

La mayoría de los hongos son mesofílicos, esto indica que crecen a temperaturas moderadas en un rango de 10-40°C y han encontrado que el crecimiento micelial les da gran ventaja, de cualquier forma dentro de sus estructuras reproductivas existe una enorme variación en el tamaño y forma de sus esporas y en la manera en que estas crecen desde la hifa. La reproducción de los hongos puede ser asexual, sexual o ambas, la forma sexual se conoce como telmórfica y la asexual como anamórfica. Los hongos están adaptados para ser parásitos, esto quiere decir que obtienen sus nutrientes directamente de otro organismo debido a que sus hifas tienen la capacidad de penetrar e invadir tejidos internos, si este tipo de parásito causa malestar en el individuo o alguna manifestación de enfermedad se le conoce como patógeno⁵⁸

En la conjuntiva de los caballos algunas especies de hongos forman parte de la flora normal y se convierten en patógenos cuando existe alguna lesión en el epitelio corneal y logran penetrar al estroma corneal. Un epitelio corneal intacto provee una excelente resistencia hacia la penetración e infección fungal; la flora normal, las lágrimas y los movimientos mecánicos de los párpados (y tercer párpado) crean un ambiente desfavorable para el crecimiento de hongos oportunistas, en adición debido a que muchos hongos no crecen a temperaturas elevadas, la temperatura normal del cuerpo es suficiente para evitar a

los oportunistas. De cualquier forma la relativa baja temperatura de la córnea en relación con el resto del ojo y del cuerpo explican la predilección de la queratomycosis como la infección ocular más común. El papel del complemento y de los anticuerpos locales en la protección en contra de las infecciones fúngicas oculares es desconocido. Las vías de entrada de los hongos al ojo es por medio de un trauma, herida o daño al epitelio corneal ocasionando una infección superficial de la córnea que se puede convertir en profunda o por vía endógena mediante la vía sanguínea.⁴⁹

Lo que ocurre comúnmente es que un hongo saprofito puede colonizar estas lesiones como es el caso del género *Aspergillus sp.* que es uno de los hongos más importantes económicamente por su papel en la industria de la fermentación, comida, microbiología y salud humana, se han reconocido 132 especies y 18 variedades y su identificación se basa en el color de su colonia, la rapidez de su crecimiento, su actividad en agua, la producción de ciertos metabolitos secundarios como las aflatoxinas y la producción de ciertas enzimas como en este caso la elastasa, además de sus características microscópicas morfológicas.⁵⁰

La mayoría de las especies de *Aspergillus sp* tienen hifas septadas, conidióforos con gran cantidad de esporas en su única cabeza conidial que puede ser globosa, hemisférica o elíptica, esta forma junto con su tamaño, ayudan para su identificación, el área fértil de esta vesícula produce las esterigmatas que son las capas que contienen las conidias o esporas hialinas o pigmentadas, con una sola serie o multiseriadas. Las enzimas extracelulares se liberan hacia el medio ambiente, las condiciones de este medio pueden restringir el crecimiento de los hongos restringiendo la liberación de sus enzimas.

Se ha demostrado que un factor de virulencia importante son las proteasas de *Aspergillus fumigatus* que tienen una función patogénica como en el caso de la elastasa produciendo daño en el tejido tisular y en este caso en el estroma corneal.⁵¹

JUSTIFICACIÓN.

Las proteinasas que contribuyen a la ulceración corneal en los periodos iniciales de la infección son de origen fúngico, bacteriano o corneal, en los siguientes periodos cuando se acumulan PMN, las proteinasas se derivan de estos PMN predominando el factor de destrucción de tejido corneal. Los neutrófilos de la película precorneal y algunos hongos están asociados con la aparición de enzimas colagenasas que son altamente destructivas y que resultan en el rápido adelgazamiento del estroma corneal, la formación de descemetocelae y la perforación total de la córnea. La actividad excesiva de proteinasas se conoce como "licuefacción" y ocasiona que la córnea presente una apariencia como derretida, de color gris y el estroma corneal gelatinoso cerca de los márgenes de la úlcera. ⁵⁰

De lo anterior surge la necesidad de determinar que microorganismos fúngicos tienen actividad proteolítica produciendo enzimas proteolíticas que ocasionan daño en el estroma corneal con el fin de efectuar el desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico y tratamiento de las queratomycosis. En este trabajo se pretende dar a conocer la variación entre la flora normal y la flora patógena ocular causante de queratitis micótica y dar a conocer los posibles hongos causantes de degradación del colágeno del estroma mediante la medición de la actividad proteolítica *in vitro* evaluando si producen la enzima elastasa que es una proteinasa exógena degradadora de la elastina, un componente del colágeno que da estructura a la córnea.

HIPÓTESIS.

En los caballos estudiados la flora bacteriana en un ojo clínicamente sano se espera que sea Gram positiva encontrándose variación con incremento de bacterias Gram negativas patógenas oportunistas en un ojo que cursa con procesos patológicos (queratitis ulcerativa) .

La presencia de hongos que forman parte de la flora conjuntival saprofita predispone a que al sufrir la córnea un daño epitelial y ocasionar que las condiciones del ambiente ocular cambien, éstos la invadirán y se verán asociados con la producción y presencia de enzimas proteolíticas, tales como colagenasa y elastasa, que son responsables de producir queratomalacia o licuefacción del colágeno que forma al estroma corneal.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Aislar, identificar y establecer una comparación entre los microorganismos encontrados en ojos sanos y en ojos enfermos para determinar cuáles de éstos parte de la flora normal y cuales son patógenos cuando las condiciones del medio cambian y los favorecen.

Objetivos particulares:

- 1) Reconocer a las bacterias que se encuentren en la córnea y conjuntiva del ojo sano en el caballo
- 2) Caracterizar los hongos que se encuentren en la conjuntiva como flora normal en el ojo sano caballo.
- 3) Identificar las bacterias que se encuentren en la córnea y conjuntiva del ojo del caballo con queratitis ulcerativa.
- 4) Mencionar las bacterias y los hongos del ambiente donde viven los caballos incluidos en el estudio.
- 5) Describir los hongos que colonizan con mayor frecuencia la córnea al tener esta un daño en su epitelio produciendo queratitis micótica, teniendo las hifas gran afinidad por el estroma corneal.
- 6) Determinar *in vitro* la actividad proteolítica ocasionada por la elastasa producida por hongos que desencadenan la degradación del colágeno del estroma corneal.

MATERIAL Y MÉTODOS.

En este estudio en total se tomaron 15 muestras de caballos con queratomicosis, 7 muestras de animales sanos y 7 muestras de medio ambiente.

Para realizar la toma de muestras mediante citología de la córnea y de la conjuntiva en ojos de caballos sanos y en ojos de caballos que presentaron queratitis ulcerativa y su cultivo *in vitro* en diferentes medios para analizar y determinar su actividad proteolítica, se acudió a diferentes estados localizados en la zona centro de la República Mexicana:

1) Querétaro

Se encuentra situado en la parte meridional de la altiplanicie mexicana, tiene clima templado subtropical con precipitación anual promedio de 625 mm y una altitud de 1700 metros sobre el nivel del mar (msnm), presenta clima templado

2) Distrito Federal

Se localiza en la altiplanicie mexicana, a 2278 msnm, precipitación anual de 600 nm, presenta clima templado seco con lluvias en el verano separado por una temporada seca corta y una superficie de 1482 km²

3) Estado de México

Presenta clima templado húmedo con precipitación de 600 nm en el valle, se localiza en la altiplanicie mexicana, cuenta con 22500 km² quedando dividido en 121 municipios políticos ⁵¹

Aquellos pacientes que se reportaron como sospechosos de ulceración corneal por presentar signos de dolor ocular, lagrimeo o secreción de algún tipo, se sometieron a un protocolo de examen oftalmológico. En los caballos que se utilizaron para la toma de muestras, se tomó en cuenta también las condiciones de las caballerizas, el tipo de cama que tenían (aserrín, viruta, estiércol, paja), el sexo, la edad, el tipo de alimentación que se les administraba y la función zootécnica que realizaban.

Los caballos normalmente cierran fuertemente sus párpados durante el examen oftalmológico que junto con el blefaroespasma hacen

imposible una buena evaluación de la córnea y de las estructuras intraoculares, el músculo del párpado oculo orbicularis innervado por el nervio palpebral, es muy fuerte en esta especie y tratar de abrirlo forzadamente con los dedos es insuficiente para lograr un buen examen; por lo que para la correcta examinación oftalmológica se tranquilizaron a los pacientes con xilacina ^a al 10% a una dosis de 0.5-1 mg/kg mediante vía intravenosa para proceder al bloqueo de los nervios motores y sensitivos con lidocaina ^b al 2% para facilitar el manejo de las estructuras oculares mediante anestesia regional. ³⁷

Los nervios frontal, lagrimal, cigomático e intratrocLEAR proveen sensación a los párpados, éstos nervios pueden ser bloqueados al inyectar anestesia local en los sitios específicos para cada uno y esto se recomienda para aumentar la paresis motora.

Para bloquear el nervio frontal y la porción medial de la rama palpebral del nervio auriculopalpebral, se identifica el foramen supraorbitario (el caballo es la única especie en donde éste foramen se encuentra extracraneal) palpando el proceso supraorbitario entre el pulgar y el dedo medio y con el índice se empuja la piel y se siente el foramen, dentro de éste foramen se inserta una aguja del número 25 y se inyecta lidocaina al 2% a dosis efecto que es de aproximadamente 1 ml. Al bloquear este sitio se bloquean también algunas ramas del nervio palpebral que se localizan en esta zona.

El nervio cigomático es bloqueado al palpar con el índice el borde ventral de la órbita en la porción supraorbital del arco cigomático y se coloca la aguja del número 25 medial al dedo y al borde de la órbita, inyectándose otro mililitro de lidocaina al 2%.

El nervio lagrimal se bloquea al colocar una aguja del número 25 e inyectar lidocaina al 2% en la parte medial del borde dorsal de la órbita justo en la parte media del canto lateral. Al bloquear este nervio se bloquea el canto lateral y el aspecto lateral del párpado superior.

El nervio intratrocLEAR se identifica al encontrar la muesca del borde superior de la órbita cerca del canto medial, se puede sentir mediante presión firme con un dedo y se coloca la aguja del número 25 y se inyecta 1 mililitro de lidocaina al 2%. ⁵²

Anexo Figura 1.

Un buen bloqueo motor produce estrechamiento de la fisura palpebral y flacidez del párpado superior.

La infiltración del nervio auriculopalpebral cuya rama temporal se dirige hacia delante y adentro sobre el músculo temporal hasta el ángulo medial del ojo y forma un plexo con las ramas terminales del nervio oftálmico y se distribuye por el músculo orbicular del ojo, se realiza con una aguja del número 25 inyectando lidocaina al 2% a dosis efecto de aproximadamente 1 mililitro en la depresión localizada en donde una línea paralela caudal a la rama de la mandíbula, intersecta a la línea paralela del borde dorsal del arco cigomático (específicamente en el proceso cigomático del hueso temporal).

Una alternativa para el bloqueo del nervio palpebral es cruzar el borde dorsal del arco cigomático justo antes de su punto más alto y el nervio es fácilmente palpado en esta área, se inserta una aguja del número 25 y se inyecta 1 mililitro de lidocaina al 2%.⁵³

Anexo Figura 2

Para el diagnóstico de úlceras corneales se realizó el siguiente protocolo en cada paciente:

EXAMEN DIAGNÓSTICO OFTALMOLÓGICO:

- 1) Observación del comportamiento del caballo a distancia
Es importante examinar la posición de la cabeza, la posición del globo ocular, la simetría de las órbitas y la posición de los párpados y observar al caballo moviéndose en su entorno para diferenciar si su movimiento es normal o si se mueve con precaución o choca con algún objeto.
- 2) Observación con iluminación natural y en la oscuridad
Se examina la apariencia general del ojo y sus anexos con luz antes de dilatar la pupila y se examina la simetría de la órbita, la función de los músculos, de los párpados y de la conjuntiva y en la oscuridad se examina la curvatura, tamaño y sensibilidad de la córnea, el tamaño de la pupila y la respuesta pupilar hacia la luz. Se recomienda palpar la órbita y hacer retropulsión del globo ocular para detectar dolor o cualquier anomalía.
- 3) Respuesta pupilar hacia la luz
Esta prueba evalúa la porción refleja del nervio óptico y la función visceral del nervio oculomotor, la prueba se realiza iluminando el

ojo con una fuente de luz brillante. Se utilizan para determinar lesiones en la pupila o en la vía nerviosa eferente o aferente, la respuesta normal es una constricción rápida de ambas pupilas.. Cuando se alumbra un ojo la pupila normal debe volverse miótica (respuesta pupilar directa), aunque la pupila del ojo dañado se encuentre miótica o no se pueda distinguir debido a las opacidades corneales, es posible evaluar una respuesta del ojo opuesto al apuntar con la luz hacia el ojo enfermo y la pupila del ojo sano debe de contraerse (respuesta indirecta o consensual). La ausencia de reflejo hacia la luz es un grave signo y nos indica un pobre pronóstico para la restauración de la visión.

4) Observación con iluminación focal

Se utiliza una lámpara *c* y se observa el ojo desde diferentes ángulos para detectar anomalías a simple vista. Se deben de evaluar también la respuesta a la amenaza (evaluar los pares craneales 2 y 7), el reflejo palpebral (par craneal 5 y su conexión con el 7 en el tallo cerebral) y la posición de los ojos (músculos extraoculares) y el movimiento ocular (pares craneales 3,4 y 6).

5) Observación con lámpara de hendidura

Se utiliza un biomicroscopio *d* que de una visión magnificada y permite observar el segmento anterior y el vítreo anterior con gran detalle haciendo una especie de corte imaginario conocido como de rebanada de pastel.

Consiste en una fuente de luz que provee iluminación difusa y un microscopio binocular que provee magnificación. La iluminación difusa se usa para detectar el grosor y lesiones que involucran a la córnea, cámara anterior, iris, cristalino o vítreo anterior.

6) Observación con oftalmoscopio indirecto

Se necesita una lente de aumento de 10x que se sostiene a 2-8 cm del ojo del caballo y se usa una lámpara para iluminar el ojo a una distancia de 50-80 cm *e*. La oftalmoscopia indirecta produce una imagen virtual, magnificada e invertida y permite examinar el segmento posterior, el nervio óptico y la retina. ⁵⁶

7) Tinción con fluoresceína de sodio, que cuando queda retenida en el estroma identificando las áreas desepitelializadas de la córnea es indicadora de un defecto epitelial corneal (úlceras corneales). La fluoresceína de sodio *f* es un compuesto fluorescente soluble en agua y de fácil observación (ésta observación debe realizarse con un oftalmoscopio que provea luz con un filtro de azul de cobalto). La fluoresceína de sodio es un agente que es fácilmente

La fluoresceína de sodio es un agente que es fácilmente impregnado en tiras estériles individuales, estas tiras no deben tocar directamente a la córnea durante su aplicación oftalmológica sino que se debe humedecer previamente la tira con alguna gota que sea lubricante (hidroxipropilmetilcelulosa) y se colocan estas gotas que caen con fluoresceína en el saco conjuntival ventral y la fluoresceína se transfiere a la película precorneal; entonces se permite que al parpadear el animal se distribuya la fluoresceína sobre la superficie corneal completa. Debido a que el epitelio corneal es selectivo a lípidos y previene una penetración corneal apreciable por la fluoresceína; en presencia de un defecto del epitelio de la córnea, la tinción difunde rápidamente al estroma corneal pues este es hidrofílico. ^{5,44}

- 8) Tinción con Rosa de Bengala ^g, es una tinción soluble en agua utilizada para evaluar la integridad de la capa de células epiteliales de la córnea que mide la capa de mucina de la película precorneal. La degeneración celular aumenta la permeabilidad y la intensidad de la tinción, el rosa de bengala es capaz de teñir células epiteliales y queratina solo cuando hay una deficiencia generalizada o un defecto focal en la capa de mucina de la película precorneal ⁷.
- 9) Cultivo corneo-conjuntival, en casos de queratitis ulcerativa se realiza frotando hisopos estériles en los márgenes de la úlcera y de la supuración en caso para remover gentilmente células de la úlcera para detectar bacterias e hifas fungales profundas y en los caballos sanos raspando gentilmente la superficie de la córnea y de la conjuntiva, en ambos casos se debe de tener cuidado de no tocar las pestañas y mantener los párpados del caballo abiertos; después, se conservaron para su transporte en medio de cultivo Stuart para la identificación posterior de los microorganismos en el laboratorio. ⁵⁵

Las muestras del ambiente se tomaron abriendo una caja de Petri y colocándola a 15 cm de distancia de la cama de las caballerizas de los caballos muestreados y se llevaron lo más pronto posible al laboratorio para su estudio evitando someterlas al sol o a temperaturas elevadas.

IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA EN EL LABORATORIO:

Para realizar el estudio de los hongos y las bacterias, es necesario recuperarlos del hábitat natural donde se encuentren y hacer que proliferen en medios artificiales que les proporcionen sus requerimientos nutricionales. A este procedimiento se le conoce como cultivo in vitro.

Los diferentes medios de cultivo que se utilizaron para cultivar hongos fueron agar Sabouraud dextrosa, extracto de malta y agar Czapek Dox para la identificación de *Aspergillus sp.* y para cultivar bacterias agar chocolate y agar sangre (5% de borrego) con infusión de cerebro corazón (BHI).

Después de tomar las muestras realizando cultivos córneo conjuntivales, estas se conservaron en medio Stuart y se transportaron al laboratorio en donde se llevó a cabo su identificación mediante el siguiente protocolo:

- 1) Con el hisopo recién salido del medio Stuart se sembró en una caja de Petri con medio Sabouraud dextrosa agar (SDA) mediante técnica de estria continua para que proliferaran los microorganismos y poder separarlos. La muestra se incubó durante 3 días en una estufa de 30° C.
- 2) Cada microorganismo que se encontró se volvió a sembrar mediante técnica de aislamiento puro de colonia en SDA y si en el caso de hongos filamentosos mediante técnica de punto aislado también en SDA y se incubaron en la estufa de 30° C.
- 3) En el diagnóstico microbiológico, la visualización del agente patógeno constituye el primer paso hacia su identificación. Ya que se obtiene cada microorganismo por separado en el caso de los hongos se hace una identificación preliminar mediante sus características generales macroscópicas, se observa el aspecto de la colonia, la textura, tiempo de crecimiento y pigmentación y difusión del pigmento al reverso de la colonia. Se puede realizar una tinción con lactofenol azul de algodón para determinar las estructuras morfológicas de hongos filamentosos y darnos una idea de que tipo de hongo puede ser.

La identificación de los hongos y de las levaduras se realizó en el laboratorio de Micología perteneciente al Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM mediante el protocolo descrito a continuación:

Técnica para realizar la tinción con lactofenol azul de algodón:

En un portaobjetos limpio se colocan 2 gotas de colorante y se adiciona la muestra tomada con un asa recta y se le coloca encima un cubreobjetos. Cada uno de los constituyentes del colorante cumple una función determinada, el fenol utilizado sirve como funguicida, la glicerina permite tener una preparación semipermanente, el azul de algodón tiñe el exterior de la pared de los hongos y el ácido láctico actúa como agente aclarante.

Para la identificación final de los hongos se realizó un microcultivo para ver las estructuras de reproducción, los tipos de micelio, morfología de las esporas y relaciones espóra-micelio.

Técnica para realizar microcultivo:

Debe de realizarse con mecheros para mantener condiciones de esterilidad

Se corta un bloque de SDA de aproximadamente 1 cm y se coloca sobre un portaobjetos

Se inoculan con esporas los cuatro lados del bloque de agar

Se coloca encima del bloque un cubre objetos utilizando unas pinzas previamente flameadas

Dentro de la caja de Petri se adicionan 10 ml de agua destilada estéril cuidando que el nivel del agua no toque el portaobjetos

Se incuba a 20° C hasta observar el desarrollo del micelio, cuando el micelio toque tanto al porta como al cubre objetos, puede realizarse su observación

Antes de observar se retira el agua destilada con pipeta y se sustituye por formol al 10% y se deja actuar durante 1-2 horas

Se retira el medio de cultivo con un bisturí y se obtiene el hongo sobre el porta y cubreobjetos

Para el examen se agregan 1 o 2 gotas de colorante lactofenol azul de algodón en un portaobjetos limpio y se coloca el cubreobjetos del microcultivo en el colorante. ⁵⁶

Si eran levaduras se sembraron en SDA y se les realizaron diferentes pruebas para su identificación:

- a) Tinción de Gram para ver sus características morfológicas
- b) Tinción con tinta china para determinar si tiene cápsula. Las partículas de carbón en rápido movimiento rebotan con la estructura capsular por lo que se aprecia un halo alrededor del organismo el cual constituye la cápsula.
- c) Tubo germinal que solo produce *Candida albicans*, se necesita una suspensión diluida de levaduras en 0.5 ml de suero y se incuba a 37° durante 3 horas
- d) Prueba de tolerancia a pH ácido para diferenciar a *Candida albicans* (rango conveniente de pH de 1.2 a 1.5 solo para esta especie, a pH mayores crece *Candida spp*)
- e) Prueba de ascosporas utilizando agar V8 para ver si se puede reproducir sexualmente
- f) Producción de clamidoconidias que son esporas esféricas de doble pared y constituye una prueba diferencial entre las especies de *Candida*, en SDA tomando una asada de la colonia con el asa en forma de L se introduce el asa y se hace una rasgadura en el fondo del agar a lo largo de la caja de Petri, se incuba a 37° y se revisa diariamente al microscopio
- g) Asimilación y fermentación de carbohidratos
- h) Confirmación por medio del sistema API 20C

En caso de que se sospechara de bacterias se resembraron en agar sangre y se tñeron mediante la tinción de Gram para su observación directa en el microscopio. La tinción de Gram divide a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas de acuerdo a los componentes predominantes de su pared celular y permite así mismo la observación microscópica de la morfología, tamaño y la agrupación que suelen presentar. Los microorganismos que conservan el cristal violeta se observan de color azul a morado (Gram positivos) y los que no lo hacen (Gram negativos) muestran un color que corresponde al de la safranina que es de color rosa o rojo. En el caso de las levaduras por las características de su pared celular se tiñen como Gram positivas.

Técnica para realizar la tinción de Gram:

Se toma la muestra con un asa redonda y se deposita en el centro de una laminilla con una gota de agua destilada

Se aplica el colorante primario que es cristal violeta, se deja reposar durante un minuto y se enjuaga

Se aplica una solución débil de lugol que actúa como mordente y se deja reposar un minuto, posteriormente se enjuaga

Se aplica acetona por unos cuantos segundos y se enjuaga, la pared de las bacterias Gram positivas sufre una deshidratación que impide la salida del colorante, en el caso de las Gram negativas el agente decolorante destruye la integridad de la membrana externa, incrementando su permeabilidad y permitiendo la salida del colorante primario.

Por último se aplica safranina que es el colorante de contraste y se deja reposando un minuto y se enjuaga.

En el caso de las bacterias después de realizar el protocolo de diagnóstico descrito anteriormente, la identificación bacteriológica se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Asociación para evitar la Ceguera mediante el sistema BBL crystal.

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA:

En el caso de los hongos cada especie aislada se conserva en SDA para someterse después al análisis y determinación de producción de enzimas proteolíticas utilizando para ello la técnica colorimétrica que emplea a la elastina con rojo Congo _h como sustrato.

La determinación de la actividad de la elastasa es una modificación al método descrito por Perlmann en 1970 y se basa en la determinación colorimétrica de la digestión de la elastasa sobre el sustrato de elastina coloreada. Para este propósito como sustrato y como medida general de actividad proteolítica se utiliza elastina con rojo congo, la reacción transcurre en buffer borato a pH 8.8 donde la enzima es estable y la absorbancia fue medida a 495 nm. ⁵⁷

La elastasa es una endopeptidasa que puede ser digerida por una gran variedad de sustratos de proteínas, tiene además la capacidad de digerir la elastina, la proteína fibrosa elástica del tejido conectivo; esta propiedad forma la base de muchos métodos de ensayo que envuelven la medición de la elastina insoluble solubilizada por la digestión mediante la elastasa durante cierto tiempo. Los ensayos más convenientes son los que utilizan la determinación colorimétrica mediante un colorante liberado dentro de una solución por la digestión de la elastasa de sustratos coloreados con elastina, midiendo así la actividad proteolítica. ⁵⁸

Para este experimento se recuperaron los hongos del medio SDA en el que se encuentran y se sembraron en medio Czapek Dox líquido para después someterlos a la prueba con elastina-rojo congo y se sometieron a medición a las 24, 48 y 72 horas para saber en que momento los hongos producen mayor cantidad de elastasa. Se realizó el siguiente procedimiento:

- 1) El sustrato elastina-rojo congo se suspende en solución buffer de borato de sodio a 0.02 M y pH de 8.8 a una concentración de 1 mg/ml

Solución de boratos:

Ácido bórico	3.8 g
Tetraborato de sodio	6.7 g
Agua de-ionizada	250 ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El agua se calienta a 70°C y los ingredientes se disuelven mediante agitación hasta lograr un pH de 8.6-8.8 y se filtra con filtros de membrana y una jeringa a presión para conservarse en un frasco estéril.

Después de preparar 100 ml de elastina-rojo congo se conserva en tubos de 10 ml y se congela a 4°C

- 2) Colocar en un tubo de ensaye 7 ml de suspensión de elastina rojo congo (desde el momento en que se prepara se debe de mantener en congelación porque son enzimas y se degradan fácilmente)
- 3) Centrifugar
- 4) Medir la densidad óptica del sobrenadante contra agua destilada
- 5) Agregar al tubo 1 ml de elastasa en solución acuosa
- 6) Agitar 5 segundos
- 7) Centrifugar 30 segundos y medir la densidad óptica mediante un espectrofotómetro a 495 nm

El espectrofotómetro es un instrumento de empleo sencillo controlado por una microprocesadora con una representación visual por un cristal líquido (LCD) de alta resolución.

Su funcionamiento se basa en un espejo motorizado que dirige la luz procedente de una de dos lámparas a través de la ranura de entrada del monocromador, esta pasa a través de uno de varios filtros dependiendo de la gama seleccionada montados en un cuadrante de filtros, la luz filtrada es dirigida a la graticula holográfica que produce la luz de la gama, esta sale del monocromador a través de la ranura de salida y los espejos enfocan y dirigen la luz hacia el compartimiento de la muestra que pasa a través de su cubeta que contiene la muestra de interés y un lente de desenfoque hacia una unidad detectora de estado sólido. La señal resultante se amplifica y se representa de manera visual. ⁵⁹

Anexo Figura 3

Ya que se midió la producción de elastasa mediante la prueba colorimétrica, se realizó la determinación de proteínas mediante el método de Bradford, el ensayo es muy reproducible y rápido, con el desarrollo completo de color en un intervalo de 2 minutos y una estabilidad de 1 hora.

Procedimiento:

- 1) Disolver 100 mg del colorante azul brillante de Coomassie en 50 ml de etanol al 95%. Adicionar 100 ml de ácido fosfórico al 85%. Diluir la solución restante a 1 litro

Concentraciones finales:

Azul brillante G-250	0.01%
Etanol	4.7%
Ácido Fosfórico	8.5%

- 2) Pipetear en tubos de ensaye la solución de proteínas de 10 a 100 mg de proteína
- 3) Ajustar el volumen a 0.01 ml con el buffer apropiado
- 4) Agregar 1 ml de solución de azul brillante
- 5) Mezclar en agitador vórtex y leer la absorbancia a 595 nm después de 2 minutos de agregado el colorante

Ya que se obtiene el reactivo que debe de tener una coloración café, se filtra mediante papel filtro y se conserva en refrigeración en frasco ámbar.

Necesitamos la curva tipo de la albúmina por ser la proteína más estable, para probar que el reactivo funcione bien, para esto se utilizaron los siguientes valores y fórmulas:

m= valor de la pendiente

b= ordenada al origen

la regresión debe ser de 0.99 en la curva tipo

Fórmula para interpolar en la curva tipo los datos de muestras (determinación de proteínas):

$$y = a + xb$$

$$x = \frac{y - a}{b}$$

Donde:

x = concentración en μg de albúmina

y = absorbancia (660 y 555 nm)

a = ordenada al origen

b = pendiente

$$\text{Abs} \times \text{dil} = z$$

En microtubos se prepararon soluciones de proteína con una concentración de 10 a 100 μg , se ajustó el volumen a 0.01 ml con regulador de buffer de boratos que es el mismo que se utilizó para la cuantificación de la enzima. Se adicionó 1 ml del reactivo de Bradford con agitación constante. La lectura de absorbancia a 595 nm se registró 2 minutos después de iniciada la reacción. ⁶⁰

Curva tipo de la albúmina:

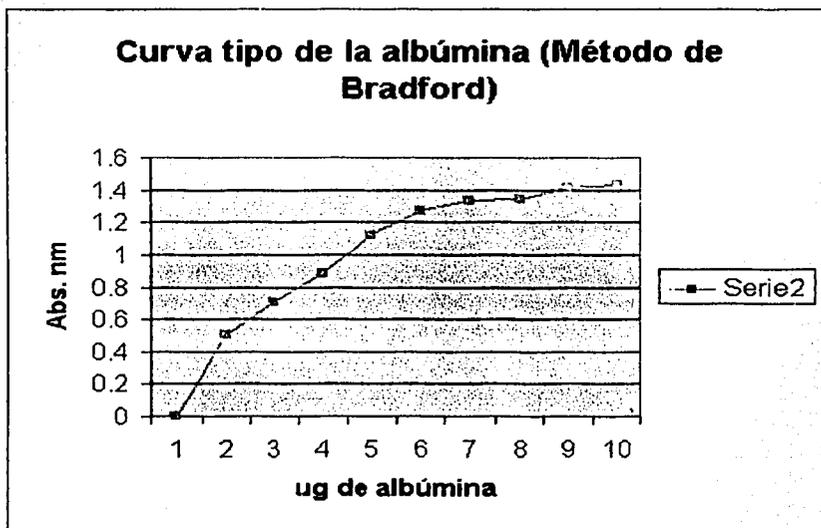
0.01 g de albúmina se disuelven en 10 ml de agua y se alicuotan en tubos Eppendorf de 1 ml, se congela ipsofacto.

μg de albúmina en μl	μl de buffer	Volumen final en ml
0 μl	100 μl	100 μl
10 μl	90 μl	100 μl
20 μl	80 μl	100 μl
30 μl	70 μl	100 μl
40 μl	60 μl	100 μl
50 μl	50 μl	100 μl
60 μl	40 μl	100 μl
70 μl	30 μl	100 μl
80 μl	20 μl	100 μl
90 μl	10 μl	100 μl
100 μl	0 μl	100 μl

Al realizar la prueba a cada muestra se le agrega 1 ml de reactivo de Bradford, se mezcla y se lee a 595 nm.

0	0
1	0.505
2	0.711
3	0.885
4	1.119
6	1.274
7	1.334
8	1.34
9	1.41
10	1.436

0.92258941 Correlación



0 Blanco	0.559	Valor real (se le restó el valor del blanco)
1	1.064	0.505
2	1.270	0.711
3	1.444	0.885
4	1.678	1.119
5	1.761	1.202
6	1.833	1.274
7	1.893	1.334
8	1.899	1.34
9	1.969	1.41
10	1.995	1.436

Correlación = 0.92
 Pendiente = .01249
 Eje de intersección B = 0.3768

Fórmula para determinar la absorbancia mediante la cual vamos a poder cuantificar la actividad específica de la proteína, poder evidenciar y graficar:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\Delta \text{ Abs } 495/\text{min}}{(\text{concentración de proteína adicionada})^\Delta}$$

A mayor coloración azul es indicativo de mayor cantidad de proteína.

Para esta determinación de proteínas se inocularon los hongos en 50 ml de caldo Czapek Dox, 50 ml de caldo SDA al 2% y 50 de caldo SDA al 4% y se dejaron en la estufa de 30° en el caso de *Aspergillus terreus* y *Aspergillus flavus*; en el caso de *Aspergillus fumigatus* se sembró a 30° y a 37° y se realizaron diferentes lecturas de las proteínas y de la actividad enzimática de las muestras a las 48, 72, 96 hrs. y una semana, como las muestras de los hongos se obtuvieron de platos de agar, la recuperación de las esporas para después inocular el caldo se realizó con solución Tween 80 al 1%. Se utilizó un medio líquido

^Δ El símbolo Δ= diferencia

porque aumenta las posibilidades de crecimiento y diluye los efectos tóxicos; cuando se obtienen los caldos inoculados se filtran primero con papel filtro y después con filtros con membranas a presión con jeringa para después utilizar los concentradores y recuperar las proteínas.

Para obtener las proteínas de los hongos se utilizaron concentradores de proteínas Centripreps¹, que son dispositivos con un contenedor, un filtro colector con una membrana y una tapón que gira y se cierra completamente, se depositan 15 ml de muestras ya filtradas en el contenedor hasta la línea indicadora que ya trae marcada el contenedor, se reinserta el filtro y se coloca el tapón de seguridad, después se centrifugan a 5000 rpm durante 10 minutos. Al sumergir el filtro colector en la solución de la muestra se crea diferente presión hidrostática que empuja la membrana del filtro colector al fondo, la centrifugación aumenta esta presión forzando al material de bajo peso molecular a ir a través de la membrana dentro del filtro colector. Los solutos con peso molecular más bajo que el permitido por los poros de la membrana se quedan en el contenedor de la muestra y este concentrado aumenta conforme la operación continúa. El filtrado obtenido se alícuota en tubos Eppendorf para realizar la medición de proteínas mediante el método del reactivo de Bradford colocando 50 μ l de la solución concentrada de los diferentes hongos, 50 μ l de solución de buffer de boratos y se agrega 1 ml de reactivo de Bradford y se mide en el espectrofotómetro a 595 nm.

Anexo figura 5 (centriprep)

El análisis de este estudio se hizo con estadística no paramétrica, se usó la estadística descriptiva utilizando primero un método deductivo (observación) y para el seguimiento de los casos oftálmicos se utilizó una cámara fotográfica Yashica dental-eye III. Para el reporte de los microorganismos encontrados en el laboratorio, se utilizó una cámara en un microscopio con aumento de 10x.

Algoritmo del plan de análisis estadístico:

1. Ordenamiento de la base de datos.
2. Análisis exploratorio de los datos: gráfico y numérico.
 - a. Obtención de estimadores: promedios, tamaños de grupo, variabilidad, máximos, mínimos, etc, por nivel de la

actividad enzimática (alta, baja) entre grupos de caballos (sanos, enfermos, su ambiente), hongos y medio de cultivo.

b. Diagramas:

i. Por nivel de la actividad enzimática (alta, baja) entre grupos de caballos (sanos, enfermos, su ambiente), hongos y medio de cultivo.

c. Determinación de suposiciones básicas de la actividad enzimática media:

i. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. En caso de cumplimiento de la normalidad se realizaría prueba de homogeneidad de varianzas entre los grupos.

ii. En este caso se rechazó la normalidad de la variable de respuesta, se intentó transformar la variable para ajustarla a la normal por la función Box-Cox. Como no fue posible hallar transformación apropiada alguna para ajustar a dicha distribución, se realizó el contraste no paramétrico de rangos múltiples de Wilcoxon/Kruskal-Wallis a nivel de significación de $\alpha = 0.05$, para comparar la actividad enzimática de la elastasa por nivel de actividad de la enzima (alta y baja), entre:

1. Hongos.
2. Sujetos: sanos, enfermos y ambiente.
3. Medios.

Posterior al contraste mencionado, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de rangos medios de Dunn, con la cual se contrastaron los distintos grupos clasificados como en el punto anterior para determinar diferencias en la actividad enzimática de la elastasa.

Se realizó una lista con las características que se iban a tomar en cuenta para la clasificación del estado de las caballerizas y medio ambiente que rodea a los caballos, se tomaba en cuenta edad, sexo, fin zootécnico, tipo de alimentación, tipo de cama y ventilación; la escala de las caballerizas fue la siguiente:

- 1 Excelente Caballeriza con cama de viruta, limpia, techo alto para tener buena ventilación e iluminación, paredes de cemento, comida sin alambres y en buen estado.
- 2 Buena Caballeriza con cama de aserrín o viruta, buena ventilación e higiene

- 3 Regular Caballeriza con cama de aserrín, paredes o puertas deterioradas
- 4 Mala Caballeriza con cama de estiércol, paredes de malla o de cemento muy deteriorado con humedad, mala ventilación y mala higiene

Las úlceras corneales también se clasificaron por grados para facilitar el análisis de los resultados:

- Grado 1.- desepitelización corneal caracterizada por epífora, blefaroespasma, positiva a tinción fluoresceína sin infiltrado
- Grado 2.- lesiones corneales persistentes superficiales con pérdida del epitelio positivas a fluoresceína, epífora, blefaroespasma, infiltrado y edema corneal
- Grado 3.- destrucción del estroma corneal, edema corneal
- Grado 4.- úlceras profundas del estroma, destrucción corneal enzimática, descemetocèle, uveítis, edema y vascularización corneal
- Grado 5.- perforación corneal, endoftalmitis ⁶¹

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan mediante el siguiente formato:
Raza, edad, sexo y función zootécnica del caballo
Localización geográfica, alimentación y estado de la caballeriza
Hallazgos oftalmológicos
Hallazgos microbiológicos con descripción macroscópica y microscópica

Caballos enfermos:

Hípicos de la Ciudad de México:

1) "Chispita"

Caso 1

Potranca de 8 meses de edad, se utilizará para salto

Se encontraba en el Cerro de la Estrella en la delegación Iztapalapa

Cama de estiércol

Clasificación de la caballeriza en el número 4, el techo es de lona y las paredes son de malla ciclónica

Se alimenta de avena en greña y grano de avena que se lo depositan en un comedero de plástico

Presentaba úlcera corneal en el ojo izquierdo (OS), al examen oftalmológico se observaba epifora seromucosa amarillenta y blefaroespasma, el ojo se veía con edema y presentaba una lesión ventrolateral de aproximadamente 7 mm positiva a la tinción con fluoresceína y con Rosa de Bengala. Esto corresponde al grado de ulceración 2.

Se encontraron los siguientes microorganismos:

- *Penicillium sp*

Miceto de rápido crecimiento que presenta pigmento amarillo al reverso, al frente la colonia es color verde grisáceo con pliegues y un halo blanco alrededor de apariencia algodonosa.

Microscópicamente su cabeza conidial es en forma de tridente, los conidióforos son hialinos y las conidias son globosas.

- *Tricothecium roseum*

Miceto de apariencia algodonosa abierta, las colonias primero son blancas y después color salmón de crecimiento moderado a rápido, presenta pigmento color naranja

Microscópicamente se ven conidias piriformes acropetálicas, erectas, septadas cerca de la base.

- *Aspergillus terreus*

Hongo con apariencia algodonosa de color amarillo al centro y blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo

Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmas, las series de esterigmas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba

Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre.

- *Corynebacterium acuatium*

Colonia de tipo mucoide color blanco perla cremosas, de rápido crecimiento macroscópicamente

Microscópicamente es un bacilo Gram (+) pleomórfico, ligeramente curvo con forma de basto en empalizada o de letras chinas, es catalasa (+)

- *Bacillus megaterium*

Colonia de tipo mucoide color blanco rugoso con bordes irregulares macroscópicamente

Bacilo Gram (+) rectos agrupados en cadenas, móviles mediante un flagelo microscópicamente, es oxidasa (+), posee cápsula y forma endosporas

2) "Gaviota"

Caso 13

Yegua, raza Cuarto de Milla, fin zotécnico salto

Caballeriza en grado 2

Cama de viruta, come heno de avena, grano de avena y alfalfa achicalada

Hípico de la ciudad de México, D.F

Presentaba al examen oftalmológico úlcera corneal profunda del estroma, seidel +, con absceso en el estroma por contaminación fungal y descemetocèle en el ojo derecho.

Grado de ulceración 4

Microorganismos encontrados:

- *Staphylococcus epidermidis*

Microscópicamente se observan cocos Gram (+)

Macroscópicamente se ven colonias redondas de color blanco

- *Aspergillus flavus*

Hongo verde limón algodonoso con un halo amarillento alrededor

En Czapek Dox las colonias son amarillas granulares y con el tiempo se oscurecen

Microscópicamente las cabezas conidiales son radiadas biseriadas y da la apariencia de que forman columnas, las fialides nacen directamente en la vesícula, la conidia es globosa y los conidióforos son hialinos

3) "Caymman"

Caso 16

Macho entero, raza Warmblood, fin zotécnico salto

Se encuentra en el club hípico las Aguilas en el DF

Presenta caballeriza grado 2

Al examen oftalmológico presentó epífora y blefaroespasma debido a una úlcera corneal profunda en el ojo izquierdo con vascularización y edema de localización central con adelgazamiento de la córnea y probable descemetocèle.

Grado de ulceración 3

Microorganismos encontrados:

Moraxella sp

Colonias macroscópicamente

Microscópicamente son cocobacilos Gram (-)

Pseudomonas sp

Colonia color crema de apariencia mucoide macroscópicamente

Microscópicamente se observan bacilos largos Gram (-) móviles con cápsula, es oxidasa (+)

Ajusco:

4) "Tomás"

Caso 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Potro raza Warmblood de 2 meses de edad
Se encontraba en el pueblo de Santo Tomás Ajusto
Cama de estiércol y paja en caballeriza de cemento
Clasificación de la caballeriza en grado 3
Se alimenta de leche materna

Al examen oftalmológico presentaba epifora y blefaroespasma bilateral, úlceras corneales bilaterales debidas a entropión congénito localizadas medialmente, positivas a la tinción con fluoresceína de sodio de aproximadamente 1 cm cada una con edema superficial.
Grado de ulceración 1.

Ojo izquierdo:

- *Penicillium sp*

Hongo con apariencia algodonosa con forma radiada, verde al centro con un halo blanco alrededor y después otro amarillento, por detrás produce pigmento amarillento.

Microscópicamente su cabeza conidial es en forma de tridente, los conidióforos son hialinos y las conidias son globosas.

- *Serratia sp*

Colonia color amarillo de apariencia mucoide esférica
Microscópicamente se ven bacilos

- *Streptococcus sp*

Colonia color blanco perla de apariencia mucoide con forma de gotas de rocío macroscópicamente

Microscópicamente se ven cocos Gram (+) formando cadenas, es catalasa (-) y oxidasa (-)

Ojo derecho:

- *Penicillium sp*

Hongo con apariencia algodonosa con forma radiada, verde al centro con un halo blanco alrededor y después otro amarillento, por detrás produce pigmento amarillento.

Microscópicamente su cabeza conidial es en forma de tridente, los conidióforos son hialinos y las conidias son globosas.

5) "Saudi"

Caso 10

Arabe, macho entero, 7 años

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caballeriza grado 2, rancho en el Ajusco

Fin zootécnico salto

Cama de aserrín con estiércol, come avena en greña

Presentaba úlcera corneal indolente en el ojo derecho con 5 meses de duración al examen oftalmológico.

Grado de ulceración 1

Microorganismos aislados:

- *Penicillium sp*

Hongo con apariencia algodonosa de rápido crecimiento, con forma radiada, verde al centro con un halo blanco alrededor y después otro amarillento, por detrás produce pigmento amarillento.

Microscópicamente su cabeza conidial es en forma de tridente, los conidióforos son hialinos y las conidias son globosas.

- *Enterobacter cloacae*

Colonia de forma redonda de color blanco macroscópicamente

Microscópicamente se ven colonias Gram (-) en forma de bacilos

6) "Toscana"

Caso 12

Arabe, yegua, 7 años

Presentaba úlcera corneal en el ojo derecho, positiva a la tinción con fluoresceína, central con epífora serosa y blefaroespasma

Grado de ulceración 2

Cama de aserrín con paja, caballeriza en grado 2

Se alimenta de heno de avena y pastorea 6 horas al día

Fin zootécnico salto

Microorganismos aislados:

- *Aspergillus fumigatus*

Hongo verde algodonoso con halo blanco alrededor, presenta pigmento amarillo mostaza por detrás.

En Czapek Dox la colonia es color verde azulado con un halo blanco muy radiada y por detrás produce pigmento café.

Microscópicamente los conidióforos son cortos y las cabezas conidiales son columnares o en forma de botella, presenta una sola línea de fialides.

- *Aspergillus terreus*

Hongo blanco con centro crema muy duro con apariencia algodonosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo

Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba

Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre.

Estado de México:

7) "Farruco"

Caso 3

Macho entero de 7 años, raza cuarto de Milla, con fin zootécnico para salto

Se encontraba en Jilotepec, Edo. de México

Cama de aserrín

Caballeriza en grado 2

Se alimentaba de avena en greña, grano de avena y alfalfa achicalada

Al examen oftalmológico presentaba epifora seromucosa y blefaroespasma en el ojo derecho (OD) y una úlcera corneal localizada laterodorsalmente de aproximadamente 1.5 cm de diámetro, positiva a las tinciones con fluoresceína y con Rosa de Bengala

Grado de ulceración 2

Microorganismos aislados:

- *Pseudomonas sp*

Colonia color crema de apariencia mucoide macroscópicamente

Microscópicamente se observan bacilos Gram (-) móviles con cápsula, es oxidasa (+)

- *Candida sp*

Colonia color crema de apariencia rugosa macroscópicamente

Microscópicamente es redonda con forma de gema Gram (+) de agrupación indefinida

Se resembró en agar Níger, V8 y Czapek Dox + Tween 80 para su identificación, se le hicieron pruebas de fermentación a carbohidratos y de tubo germinal

8) "Bandida"

Caso 5

Yegua, 10 años

Se encontraba en Jilotepec, Edo. de México

Cama de viruta, come avena en greña

Caballeriza en grado 2

Fin zootécnico salto

Al examen oftalmológico presentaba ulceración corneal bilateral con retención de fluoresceína y edema corneal con epifora serosa y fotofobia

Grado de ulceración 2

Ojo izquierdo:

- *Mucor sp*

Miceto de colonias de muy rápido crecimiento de apariencia filamentosa color café muy algodonoso que se va obscureciendo con el crecimiento de esporangios.

Microscópicamente se ven hifas delgadas no septadas muy esporuladas y esporangioforos erectos con un collarite en la base de la columnela.

Se realizó crecimiento en frío y no presenta rizoides ni estolones.

Ojo derecho:

- *Aspergillus flavus*

Hongo verde algodonoso con un halo amarillento alrededor

En Czapek Dox las colonias son amarillas y con el tiempo se obscurecen

Microscópicamente las cabezas conidiales son radiadas y los conidióforos son hialinos

9) "Gladiador"

Caso 14

Macho entero, raza Farabella

Villa del carbón, Edo. De México

Caballeriza en grado 2

Cama de paja con aserrín, come alfalfa acicalada y heno de avena

Presentaba úlcera corneal OS con prolapso de iris, vascularización y edema alrededor del prolapso además de epifora mucosa y bordes del prolapso de color blanco con abscesos en el estroma corneal

Grado de ulceración 5

Microorganismos encontrados:

- *Enterobacter aerogenes*

Microscópicamente se observan bacilos Gram (-) con agrupación indefinida

Macroscópicamente se observan colonias gris opaco de apariencia mucoide

- *Aspergillus terreus*

Hongo blanco con centro crema muy duro con apariencia algodonosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo

Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba

Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre.

Querétaro:

10) "Chamizal"

Caso 6

Macho entero, 9 años

Se encontraba en Balvanera, Querétaro

Cama de viruta, come avena en greña

Fin zootécnico salto

Caballeriza en grado 2

Al examen oftalmológico presentó epifora mucosa, blefaroespasmos, edema y vascularización corneal con una ulceración corneal ventromedial con tinción positiva a la fluoresceína en el ojo derecho

Grado de ulceración 3

Microorganismos aislados:

- *Aspergillus fumigatus*

Hongo verde algodonoso con halo blanco alrededor, presenta pigmento amarillo mostaza por detrás

En Czapek Dox la colonia es color verde azulado y por detrás produce pigmento café.

Microscópicamente los conidióforos son cortos y las cabezas conidiales son columnares.

- *Aspergillus terreus*

Hongo de apariencia dura color crema con halo alrededor blanco y pigmento café oscuro por detrás

Microscópicamente la cabeza conidial se ve con forma de escoba por la gran esporulación y las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmas, las series de esterigmas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas.

Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre

11) "Eficaz"

Caso 4

Macho castrado, raza Cuarto de Milla de 10 años

Al examen oftálmico presentaba úlcera corneal profunda con adelgazamiento central, positivo a fluoresceína, epífora seromucosa y blefaroespasma

Grado de ulceración 4

Se encontraba en el club hípico Balvanera en Querétaro

Cama de aserrín, come avena en greña, alfalfa y grano de avena

Fin zootécnico salto

Caballeriza en grado 2

Microorganismos aislados:

- *Staphylococcus aureus*

Colonias esféricas convexas macroscópicamente

Microscópicamente se ven cocos Gram (+) que se agrupan en racimos o en pares, son catalasa (+)

- *Aspergillus niger*

Hongo con cabezas conidiales grandes, globosas, los conidióforos son hailinos, las cabezas conidiales son biseriadas con las fiáldes café y las conidias son globosas.

En Czapek Dox la colonia es blanca o amarillenta en la base, cubierta por cabezas conidiales color café.

Estado Mayor Presidencial:

12) "Eclipse"

Caso 7

Macho castrado, 10 años

Cama de viruta

Caballeriza en grado 1

Alimentación con paja de avena y grano de avena

Fin zootécnico salto

Al examen oftalmológico presentó epifora y blefaroespasma con una úlcera corneal profunda con severo edema y vascularización y un absceso en el estroma corneal con riesgos de descemetocel, positiva a tinción de fluoresceína solo en las orillas de la úlcera en el ojo izquierdo

Grado de ulceración 4

Microorganismos aislados:

- *Rhizomucor sp*

Hongo muy filamentoso color café de apariencia compacta con pigmento café grisáceo.

Se sembró en frío y formó estolones y rizoides.

Microscópicamente es un hongo no septado con un septo debajo del esporangio, no produce clamidosporas.

- *Staphylococcus aureus*

Microscópicamente se ven cocos Gram (+) agrupados en racimos pares o en cadenas cortas

Colonias esféricas convexas de color blanquecino de borde entero y pigmentado macroscópicamente

Son catalasa (+)

- *Nocardia sp.*

Colonia de apariencia pequeña y seca muy dura color blanco de crecimiento lento macroscópicamente

Microscópicamente son bacilos Gram (+) que se ven como filamentos ramificados

13) "Dan"

Caso 9

Percheron, entero, 21 años de edad

Caballeriza grado 1

Cama de viruta, come heno de avena, alfalfa achicalada y grano de avena

Fin zootécnico para tiro

Presentaba al examen oftalmológico perforación de córnea con prolapso de iris en el ojo derecho de aproximadamente .5 mm de localización

ventromedial, negativo a la tinción con fluoresceína (Seidel negativo) y epifora seromucosa
Grado de ulceración 5
Microorganismos aislados:

- *Aspergillus terreus*

Hongo verde olivo muy esporulado de consistencia terrosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo
Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba
Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre.

Hipódromo de las Américas:

14) "Zolo two"

Caso 8

Macho entero de 8 años de edad

Cama de viruta, se alimenta de grano de avena y avena en greña

Caballeriza en grado 3

En el examen oftalmológico presentó úlcera corneal bilateral con edema corneal y se reportó que era tratado con garamicina oftálmica

Grado de ulceración 2

Fin zootécnico carreras

Microorganismos encontrados:

- *Aspergillus terreus*

Hongo blanco con centro crema muy duro con apariencia algodonosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo
Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba
Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre.

UNAM:

15) "No que no"

Macho castrado, cuarto de milla, fin zootécnico charrería
Caballeriza en grado 2

Se alimenta de paja de avena y grano de avena

Al examen oftalmológico presentó uveítis severa ocasionada por un absceso corneal OD formado por parálisis del nervio facial

Grado de ulceración 4

Microorganismos obtenidos:

- *Aspergillus fumigatus*

Hongo verde algodonoso con halo blanco alrededor, presenta pigmento amarillo mostaza por detrás.

En Czapek Dox la colonia es color verde azulado con un halo blanco muy radiada y por detrás produce pigmento café.

Microscópicamente los conidióforos son cortos y las cabezas conidiales son columnares o en forma de botella, presenta una sola línea de fialides.

- *Penicillium sp*

Hongo con apariencia algodonosa de rápido crecimiento, con forma radiada, verde al centro con un halo blanco alrededor y después otro amarillento, por detrás produce pigmento amarillento.

Microscópicamente su cabeza conidial es en forma de tridente, los conidióforos son hialinos y las conidias son globosas.

Caballos sanos:

1) Distrito federal

Caso 11

Tordillo, entero, español, "General"

Caballeriza grado 1

Cama de viruta, se alimenta de grano de avena, alfalfa achicalada y heno de avena

Función zootécnica rejoneo

En el examen oftalmológico presentaba hiperplasia de la glándula del tercer párpado en el ojo izquierdo sin lesiones en la córnea

Microorganismos encontrados:

- *Streptomyces sp*

Colonia café grisacea de crecimiento lento
Microscópicamente se ven formas miceliales Gram (-)

- *Staphylococcus aureus*

Microscópicamente se ven cocos Gram (+) agrupados en racimos pares o en cadenas cortas
Colonias esféricas convexas de color blanquecino de borde entero y pigmentado macroscópicamente
Son catalasa (+)

2) Querétaro

Macho entero, raza Oldenburg, "Classic"

Caballeriza grado 2

Cama de viruta, se alimenta de heno de avena, grano de avena y pastoreo libre durante el día.

Microorganismos encontrados:

- *Vibrio mimicus*

Microscópicamente se ven bacilos Gram (-)
Oxidasa (+)

- *Staphylococcus aureus*

Colonias esféricas convexas macroscópicamente
Microscópicamente se ven cocos Gram (+) que se agrupan en racimos o en pares, son catalasa (+)

3) EMP

Yegua, PSI, 12 años, fin zootécnico prueba completa de 3 días, "Exclusiva"

Caballeriza grado 2

Se alimenta de grano y heno de avena, alfalfa achicalada

Microorganismos aislados:

- *Staphylococcus aureus*

Colonias esféricas convexas macroscópicamente
Microscópicamente se ven cocos Gram (+) que se agrupan en racimos o en pares, son catalasa (+)

- *Streptococcus sp*

Colonia color blanco perla de apariencia mucoide con forma de gotas de rocío macroscópicamente
Microscópicamente se ven cocos Gram (+) formando cadenas, es catalasa (-) y oxidasa (-)

4) Hipódromo de las Américas

Caballeriza grado 3

PSI, macho entero, fin zootécnico carreras, "Passport"

Microorganismos aislados:

- *Aspergillus terreus*

Hongo verde olivo con apariencia algodonosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo

Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba

Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre.

- *Bacillus megaterium*

Colonia de tipo mucoide color blanco rugoso con bordes irregulares macroscópicamente

Bacilo Gram (+) rectos agrupados en cadenas, móviles mediante un flagelo microscópicamente, es oxidasa (+), posee cápsula y forma endosporas

5) Estado de México

Yegua Holsteneir, "Alfa Roca"

Caballeriza grado 3

Se alimenta mediante pastoreo libre y suplemento de grano de avena

Microorganismos encontrados:

- *Acinetobacter wolfii*

Colonia mucoide redonda blanca de crecimiento lento macroscópicamente.

Microscópicamente se ven bacilos Gram (-)

- *Streptococcus sp*

Colonia color blanco perla de apariencia mucoide con forma de gotas de rocío macroscópicamente
Microscópicamente se ven cocos Gram (+) formando cadenas, es catalasa (-) y oxidasa (-)

6) UNAM

Macho castrado, criollo, "Treinta treinta"
Caballeriza grado 1
Cama de viruta, se alimenta de heno de avena
Microorganismos aislados:

- *Aspergillus terreus*

Hongo verde olivo con apariencia algodonosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo
Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba
Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre.

- *Penicillium sp*

Hongo muy esporulado con apariencia algodonosa de rápido crecimiento, con forma radiada, verde al centro con un halo blanco alrededor y después otro amarillento, por detrás produce pigmento amarillento.
Microscópicamente su cabeza conidial es en forma de tridente, los conidióforos son hialinos y las conidias son globosas.

7) Ajusco

Macho entero raza Hannover, fin zootécnico adiestramiento, "Forrest"
Caballeriza grado 1
Cama de viruta, se alimenta de heno y grano de avena
Microorganismos aislados:

- *Penicillium sp*

Hongo muy esporulado con apariencia algodonosa de rápido crecimiento, con forma radiada, verde al centro con un halo blanco

alrededor y después otro amarillento, por detrás produce pigmento amarillento.

Microscópicamente su cabeza conidial es en forma de tridente, los conidióforos son hialinos y las conidias son globosas.

- *Corynebacterium acuaticum*

Colonia de tipo mucoide color blanco perla cremosas, de rápido crecimiento macroscópicamente

Microscópicamente es un bacilo Gram (+) pleomórfico, ligeramente curvo con forma de basto en empalizada o de letras chinas, es catalasa (+)

Ambiente:

a) Estado Mayor Presidencial

Hípico localizado en el Distrito Federal con caballerizas grado 1, proporcionan a sus caballos una dieta basada en alfalfa achicalada, paja de avena y grano de avena.

Microorganismos encontrados:

- *Madurella sp*

Colonias de lento crecimiento color amarillo, con pigmento café por detrás macroscópicamente.

Microscópicamente las colonias se ven con forma de mano (conidióforos separados en ramas) con conidias redondas o piriformes.

- *Aspergillus terreus*

Hongo verde olivo con apariencia algodonosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo

Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba

Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre.

b) Unidad Médica Equina Santo Tomás

Hospital localizado en el pueblo de Santo Tomás Ajusco, con caballerizas en grado 1, proporcionan a sus pacientes una dieta basada en heno de avena.

Microorganismos encontrados:

- *Verticillium sp*

Colonias de rápido crecimiento color verde con pigmento color canela por detrás. Los conidióforos son erectos y separados con fialides bien diferenciadas y divergentes, las conidias son hialinas. Se ha reportado que produce queratitis micótica y se aísla generalmente del ambiente.

- *Aspergillus fumigatus*

Hongo verde algodonoso con halo blanco alrededor, presenta pigmento amarillo mostaza por detrás.

En Czapek Dox la colonia es color verde azulado con un halo blanco muy radiada y por detrás produce pigmento café.

Microscópicamente los conidióforos son cortos y las cabezas conidiales son columnares o en forma de botella, presenta una sola línea de fialides.

c) Clínica para equinos UNAM-FMVZ

Hospital localizado en el sur del Distrito Federal, con caballerizas en grado 1, proporcionan a sus pacientes una dieta basada en paja de avena.

Microorganismos encontrados:

- *Aspergillus terreus*

Hongo verde olivo con apariencia algodonosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo

Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba

Se realizó cultivo en Czapek-Dox para ver el color de su pigmento y poder identificar la especie, las colonias son color canela y presentan pigmento ocre

- *Penicillium sp*

Hongo muy esporulado con apariencia algodonosa de rápido crecimiento, con forma radiada, verde al centro con un halo blanco

alrededor y después otro amarillento, por detrás produce pigmento amarillento.

Microscópicamente su cabeza conidial es en forma de tridente, los conidióforos son hialinos y las conidias son globosas.

d) Club hípico Ciudad de México

Localizado en el Bosque de Chapultepec en el Centro del Distrito Federal con caballerizas en grado 2, proporcionan a sus caballos una alimentación basada en heno de avena, alfalfa achicalada y grano de avena.

Microorganismos encontrados:

- *Aspergillus fumigatus*

Hongo verde algodonoso con halo blanco alrededor, presenta pigmento amarillo mostaza por detrás.

En Czapek Dox la colonia es color verde azulado con un halo blanco muy radiada y por detrás produce pigmento café.

Microscópicamente los conidióforos son cortos y las cabezas conidiales son columnares o en forma de botella, presenta una sola línea de fialides.

- *Staphylococcus aureus*

Colonias esféricas convexas macroscópicamente

Microscópicamente se ven cocos Gram (+) que se agrupan en racimos o en pares, son catalasa (+)

e) Hipódromo de las Américas

Localizado en la zona noroeste de la ciudad de México, la dieta de sus caballos es a base de grano de avena y paja de avena, presentan caballerizas de dos pisos, son grado 3 las que se encuentran en lo que se considera como la planta baja y grado 2 las que se encuentran en el primer piso

- *Aspergillus fumigatus*

Hongo verde algodonoso con halo blanco alrededor, presenta pigmento amarillo mostaza por detrás.

En Czapek Dox la colonia es color verde azulado con un halo blanco muy radiada y por detrás produce pigmento café.

Microscópicamente los conidióforos son cortos y las cabezas conidiales son columnares o en forma de botella, presenta una sola línea de fialides.

- *Aspergillus terreus*

Hongo verde olivo con apariencia algodonosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo

Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo que da la apariencia de una escoba

Su cultivo en Czapek-Dox presenta pigmento color ocre y las colonias son color canela.

f) Centro ecuestre Balvanera

Centro ecuestre ubicado en Querétaro, la dieta de sus caballos es a base de pastoreo libre de pasto verde y suplementación con grano de avena

- *Penicillium sp*

Hongo muy esporulado con apariencia algodonosa de rápido crecimiento, con forma radiada, verde al centro con un halo blanco alrededor y después otro amarillento, por detrás produce pigmento amarillento.

Microscópicamente su cabeza conidial es en forma de tridente, los conidióforos son hialinos y las conidias son globosas.

g) Rancho ubicado en Villa del Carbón

Rancho localizado en el Estado de México con caballerizas grado 3 con demasiado polvo porque el lugar no está pavimentado, la dieta de los caballos es a base de pastoreo libre y se les adiciona grano de avena.

Microorganismos encontrados:

- *Aspergillus terreus*

Hongo verde olivo con apariencia algodonosa de color blanco alrededor, por detrás presenta pigmento amarillo

Microscópicamente las cabezas conidiales presentan dos series de esterigmatas, las series de esterigmatas casi cubren de lado a lado, conidias con tonalidad café, son ovaladas y lisas y es muy esporulado lo

que da la apariencia de una escoba. Cultivado en Czapek-Dox el color de su pigmento es ocre y las colonias son color canela.

- *Verticillium sp*

Colonias de rápido crecimiento color verde con pigmento color canela por detrás. Los conidióforos son erectos y separados con fialides bien diferenciadas y divergentes, las conidias son hialinas. Se ha reportado que produce queratitis micótica y se aísla generalmente del ambiente.⁶²

Anexo Cuadro 3.

La mayoría de los hongos encontrados fueron del género Eumycota que son hongos con pared verdadera y de la familia Deuteromycotina que son hongos imperfectos, típicamente tienen un micelio y pueden alternar entre fase micelial y fase de levadura, su pared está hecha de quitina, se reproducen con reproducción asexual mediante conidias o formando células conocidas como fialides, la reproducción sexual en este género es muy rara.⁶³

Anexo Figura 4

Al realizar la prueba colorimétrica para la estimación de la actividad proteolítica de los hongos encontrados midiendo su producción de elastasa con la elastina rojo-congo, se obtuvieron los resultados escritos en el cuadro 4 anexo al final de la tesis.

El reactivo de Bradford es el blanco y en el espectrofotómetro medido a 595 nm nos dio un valor de 0.550

Los resultados obtenidos para la determinación de proteínas de los hongos utilizando el método de Bradford se anexan resumidos en el cuadro 4 junto con el valor de la actividad específica de la elastasa de los hongos que la produjeron aplicando la fórmula anteriormente descrita y el porcentaje real entre las proteínas y la actividad enzimática se anexa en el cuadro 5.

Incidencia personal obtenida en este estudio:

Machos 73.33%
Hembras 26.66%

Mayor incidencia en caballerizas grado 2
Cama de viruta

El hongo que estuvo más veces en enfermos, sanos y ambiente fue *Aspergillus terreus* encontrándose en 12 ocasiones de 15 casos, seguido por *Aspergillus fumigatus* en 6 ocasiones.

	Número de casos	Porcentaje
Distrito Federal	3	20%
Querétaro	2	13.33%
UNAM	1	6.67%
Edo de México	3	20%
Hipódromo	1	6.67%
Ajusco	3	20%
EMP	2	13.33%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este estudio con los casos de queratomycosis equina descritos anteriormente nos muestran úlceras corneales en diferentes estadios, bilaterales y unilaterales, lesiones superficiales y profundas hasta queratitis generalizadas profundas con uveítis anterior y perforaciones corneales; sin embargo, analizando los resultados se encontró que no había relación directa en cuanto al grado de severidad del cuadro con el número de bacterias encontradas ni con la actividad zootécnica del paciente así como el sexo, la alimentación y la raza.

El método de exploración oftálmica empleado fue el adecuado para diagnosticar y diferenciar animales sanos de animales con queratomycosis. Con el método utilizado de hisopo estéril para la toma de muestras corneales de ojos se obtuvieron 10 géneros micóticos distintos, 1 levadura y 13 diferentes bacterias y se recomienda como un método adecuado para la toma de muestras en este tipo de estudios. Es importante enfatizar que las muestras oftálmicas después de obtenerse deben de conservarse en el medio de transporte adecuado (Stuart) y ser conservadas de preferencia en refrigeración para llevarse lo antes posible al laboratorio para su cultivo e identificación.

Los microorganismos Gram (+) encontrados en los ojos sanos de control fueron *Staphylococcus aureus*, *Vibrio mimicus* y *Streptomyces sp* entre otros, éstos fueron similares a los géneros bacterianos aislados de ojos equinos normales reportados en otros estudios y con estos resultados se corrobora la hipótesis propuesta en este estudio sobre la variación de microorganismos Gram (+) a Gram (-) en casos de ulceración corneal, encontrándose en ojos de caballos enfermos *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* *Enterobacter sp.* y *Serratia sp.* entre otras bacterias.⁶⁴

Se encontraron diferentes géneros de hongos filamentosos, *Aspergillus sp* fue el género micótico que con mayor frecuencia se aisló tanto en ojos sanos como en enfermos, sin embargo, en aquellos pacientes con queratomycosis encontramos una asociación de este con bacterias Gram (-) como lo reportado por Nasisse y sus colaboradores. En este estudio los hallazgos indican que la prevalencia de hongos está directamente relacionada al medio inmediato del caballo.²⁶

Es bien sabido que el hongo que con mayor frecuencia se encuentra como flora normal en caballos y en lesiones patológicas

oportunista es *Aspergillus fumigatus*, este hongo en este estudio lo encontramos en un 20.69%, de una mayor relevancia resultó el haber aislado *Aspergillus terreus* en un 41.38%, lo cual constituyó hasta nuestro conocimiento el primer reporte de este género como causante de queratitis micótica en caballos y así mismo este es el primer estudio en el que además se analiza la actividad proteolítica de este género.

Por otro lado encontramos otros géneros micóticos no reportados en la literatura como *Madurella sp* que no demostró producción de actividad proteolítica en nuestro estudio y *Verticillium sp* con actividad enzimática moderada que se aisló en varias muestras de ojos sanos y en una sola muestra de ambiente por lo que se puede pensar que no es un género micótico patógeno oportunista causante de queratomycosis en caballos por que probablemente no se encontraba en las condiciones favorables para proliferar en los casos de caballos con queratomycosis, esto se puede deber a que su temperatura óptima de crecimiento es de 21-24 °C y cuando existe un proceso inflamatorio en la córnea se provocan los signos cardinales de la inflamación, uno de éstos es el calor o aumento de la temperatura, ocasionando este aumento la proliferación de otros géneros micóticos como *Aspergillus sp.* cuya temperatura favorable de crecimiento es de 30-37 °C, y disminuyendo así las posibilidades de crecimiento de *Verticillium sp.*, debiendo considerarse entonces este género como parte de la flora normal.

Haciendo una comparación entre caballos con úlceras corneales en los casos en los que había asociación entre hongos y bacterias Gram (+) la evolución fue más lenta sin llegar a tener progresión en profundidad y perforarse; en cambio cuando existía asociación entre hongos y bacterias Gram (-) el grado de progresión y severidad del cuadro clínico fue mayor presentando algunos casos perforación corneal.

El método para medir la actividad enzimática producida por los diferentes hongos que cultivamos, mediante una prueba colorimétrica en donde utilizamos elastina-rojo congo como sustrato, fue el adecuado por ser fácilmente reproducible de acuerdo con los elementos con los que se cuenta en el laboratorio, como el espectrofotómetro y diferentes medios de cultivo, además de la rapidez para su realización y consideramos que fue el apropiado para los fines que necesitábamos en esta investigación.

Hablando de la actividad enzimática, en este estudio el tiempo de mayor producción de elastasa mostrado por los géneros micóticos que se encontraron fue de 72 horas y coincide con el tiempo mencionado por Slansky en 1996 sobre la mayor destrucción del estroma corneal y el

tiempo que tarda una córnea en perforarse cuando sufre un proceso de queratomycosis.³⁴

En cuanto al análisis de la actividad proteolítica en ojos sanos, enfermos y en ambiente encontramos los mismos hongos, sin embargo la actividad enzimática indicó que el productor de mayor cantidad de elastasa fue *Aspergillus terreus* seguido por *Aspergillus fumigatus*, ambos en enfermos y en el ambiente.

Un punto importante en el análisis de la actividad enzimática mostró en aquellos pacientes enfermos una mayor actividad que en sanos lo que nos demuestra que al haber una mayor actividad de elastasa habrá una mayor destrucción del tejido estromal y con esto una mayor progresión de la lesión y mayor riesgo de perforación corneal.

Este es el primer reporte en el que se analiza la actividad enzimática de los hongos involucrados en queratomycosis en caballos y puede ser un elemento importante en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos pacientes.

Con base en los resultados obtenidos de las pruebas estadísticas de los casos observados, se deduce mediante la comparación de rangos múltiples de Wilcoxon/Kruskal-Wallis que no existió diferencia para la actividad enzimática entre los tres diferentes medios de cultivo, en cambio en general podemos decir que la actividad enzimática si depende o está asociada a la especie de hongo localizado en el ojo tanto en sanos como en enfermos la producción de elastasa es básica ya que constituye un precursor importante del colágeno que forma parte del estroma corneal y su determinación ayuda al clínico a establecer un rápido diagnóstico y tratamiento.

Las gráficas estadísticas demuestran hongos que mostraron actividad enzimática alta, los cuales demostraron variación dependiendo del ambiente donde se recolectaron las muestras y variando entre caballos enfermos, sanos y ambiente de los caballos.

Aspergillus terreus y *Aspergillus fumigatus* se encontraron en el ambiente, en caballos enfermos y en sanos demostrando mayor actividad proteolítica en caballos enfermos. *Penicillium sp.* se encontró en caballos enfermos y sanos con actividad proteolítica alta moderada. *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* demostraron una actividad enzimática alta en animales enfermos, no así en caballos sanos o en ambiente en donde no fueron aislados. El hongo *Tricothecium roseum* se encontró en animales enfermos pero no mostró una actividad

proteolítica significativa. En el caso de *Rhizomucor sp.* y *Mucor sp.* se encontró que tenían actividad enzimática moderada siendo mayor en el medio SDA al 4% y mucho menor en Czapek Dox, lo cual es lógico por las características de los ingredientes de cada medio y las exigencias de los requerimientos nutricionales que estos hongos necesitan para proliferar. *Madurella sp.* se encontró solamente en animales enfermos con actividad enzimática alta moderada y *Verticillium sp.* en animales sanos y en una muestra de medio ambiente. Estos resultados obtenidos de la medición de la actividad proteolítica de los hongos cultivados de acuerdo al medio en el que se sembraron se explican de una manera gráfica en el anexo llamado figura 7 para poder realizar una fácil comparación entre los valores obtenidos de producción de elastasa.

En resumen, en este estudio la actividad enzimática fue mayor en el grupo de los enfermos con *Aspergillus terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* en ese orden, siendo el de mayor producción en los sanos *Verticillium sp.* y *Aspergillus terreus* y *A. fumigatus* en el ambiente, sin ser los valores encontrados tan altos como en el caso de los enfermos.

Los hongos que no aparecen en las gráficas es porque no fueron hallados o porque no mostraron actividad proteolítica, lo cual se comprueba en las gráficas individuales realizadas a cada hongo y a su actividad enzimática en los diferentes medios de cultivo del anexo llamado cuadro 4 al final del trabajo.

Se enfatiza la importancia de mantener a los caballos con queratomicosis en el ambiente más higiénico posible durante el periodo del tratamiento para reducir la exposición a esporas de hongos del ambiente dado que se muestra evidencia en los resultados obtenidos de que las queratomicosis más severas en los caballos se pueden relacionar con la contaminación del ambiente inmediato (camas, pisos sucios, polvo).

CONCLUSIONES.

- 1) Las bacterias encontradas en los ojos de caballos sanos pertenecieron en su mayoría a microorganismos Gram (+), siendo comensales que intentan inhibir microorganismos patógenos mediante competencia por los nutrientes que el medio provea.
- 2) En la conjuntiva de los ojos de caballos clínicamente sanos se encontraron hongos filamentosos que son potencialmente patógenos si invaden la córnea al sufrir esta una pérdida del epitelio.
- 3) Cuando los caballos sufren un daño corneal el medio ambiente ocular varía sus condiciones, favoreciendo la disminución de organismos Gram (+) y permitiendo la proliferación de organismos Gram (-) que individualmente son incapaces de causar una infección significativa pero al combinarse con otras bacterias producen factores patogénicos que pueden causar una enfermedad severa.
- 4) Las poblaciones de microorganismos encontrados en el ambiente donde viven los caballos estudiados fueron en su mayoría hongos filamentosos y bacterias Gram (+), esto puede variar dependiendo de la zona geográfica, la alimentación, el clima, la estación del año y las técnicas de cultivo.
- 5) En caballos con queratomycosis se encontraron hongos septados patógenos oportunistas cuyas hifas tienen gran afinidad por invadir al estroma corneal y la membrana de Descemet como el género *Aspergillus spp.*
- 6) Si los hongos invaden el estroma corneal lo destruyen al liberar enzimas proteolíticas, esta actividad proteolítica varía de forma individual dependiendo del género micótico produciendo mayor o menor cantidad de elastasa que es un componente estructural del colágeno que constituye la mayor parte del estroma corneal.

FIGURAS

FIGURA 1

Diagrama de inervación sensorial de los párpados:

- 1.- Nervio frontal
- 2.- Nervio intratroclear
- 3.- Nervio lagrimal
- 4.- Nervio zigomático

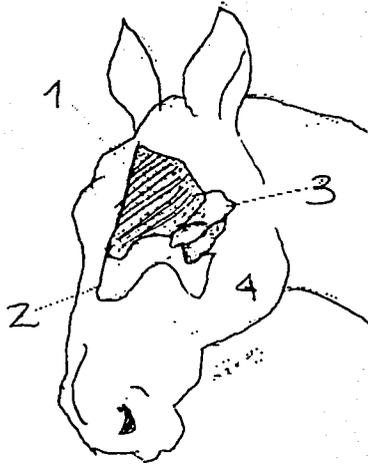
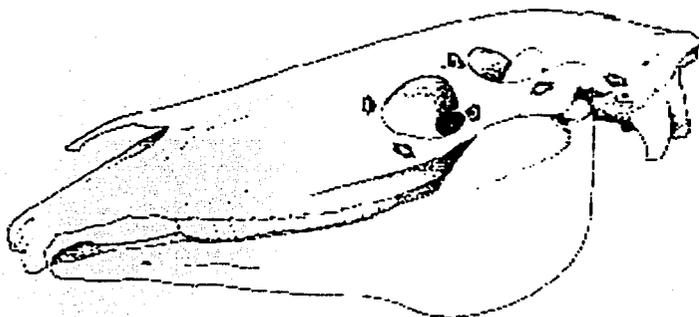


FIGURA 2

Vista lateral de un cráneo demostrando los sitios para bloqueos nerviosos regionales oculares:



- 1.- Nervio IntratrocLEAR
- 2.- Nervio frontal
- 3.- Nervio lagrimal
- 4.- Nervio cigomático
- 5.- Nervio auriculopalpebral
- 6.- Nervio palpebral

FIGURA 3:

Preparación del sistema para el análisis de la actividad proteolítica:

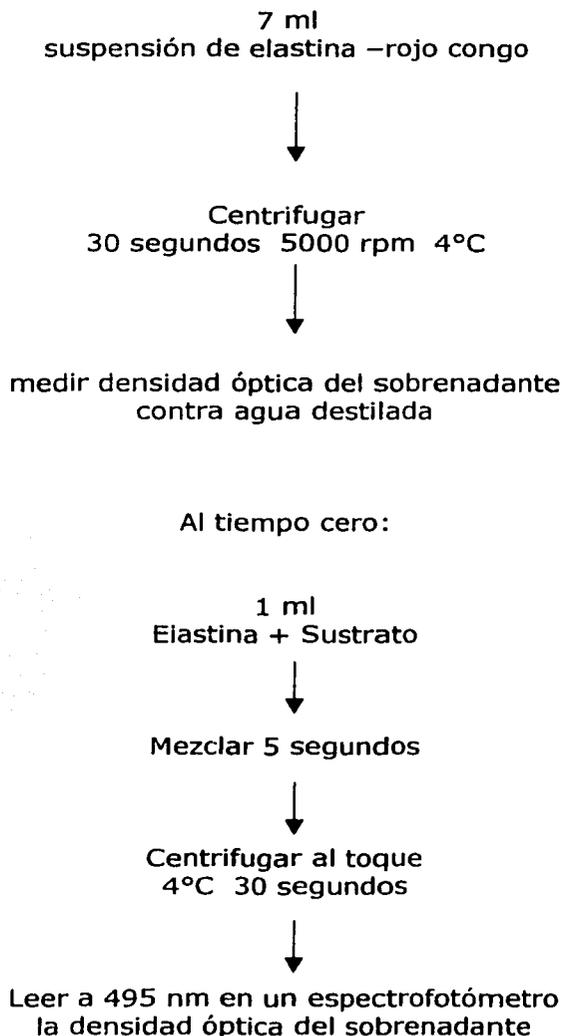
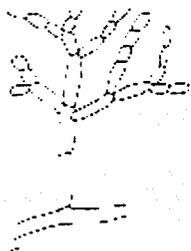


FIGURA 4:

Representaciones de los principales hongos Deuteromycotina:

Cladosporium sp.



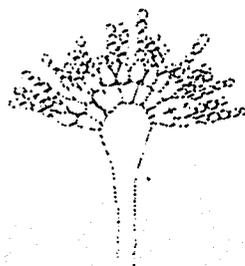
Alternaria sp.



Penicillium sp.



Aspergillus sp.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 5:

Concentradores de proteínas Centriprep:

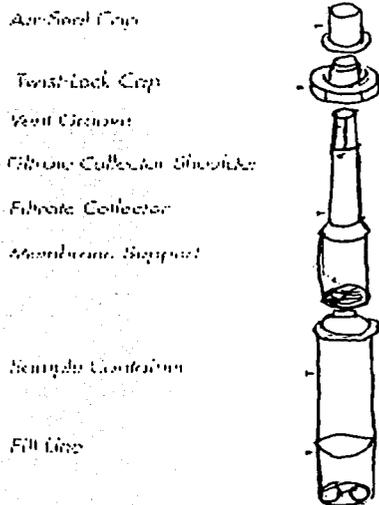


FIGURA 6.

Asociación entre hongos y bacterias y su presencia en muestras tomadas de caballos sanos y enfermos.

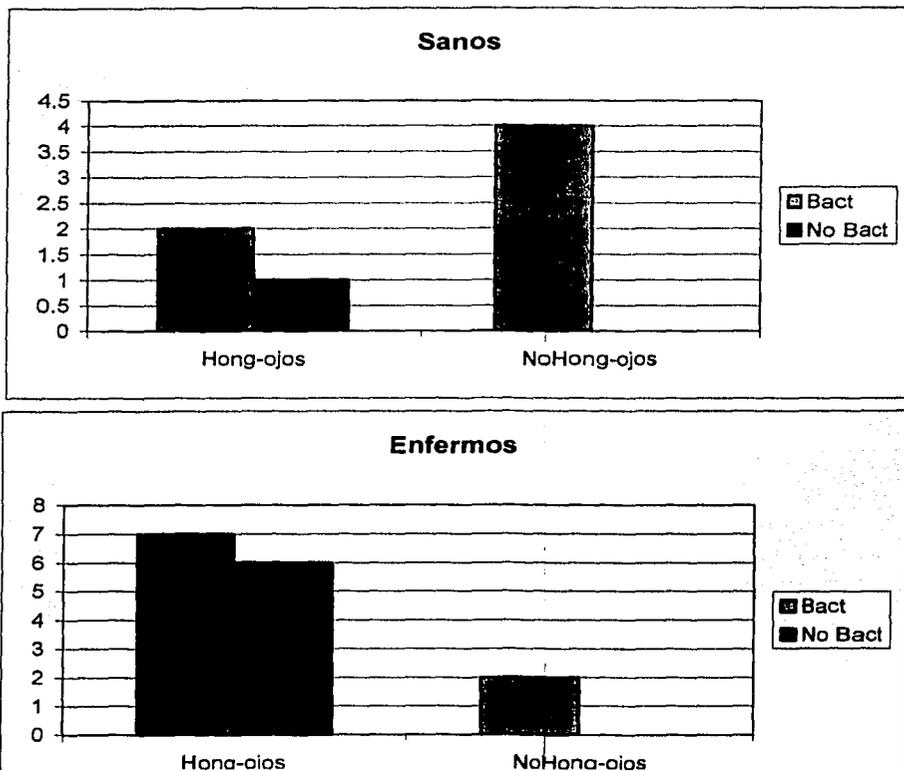
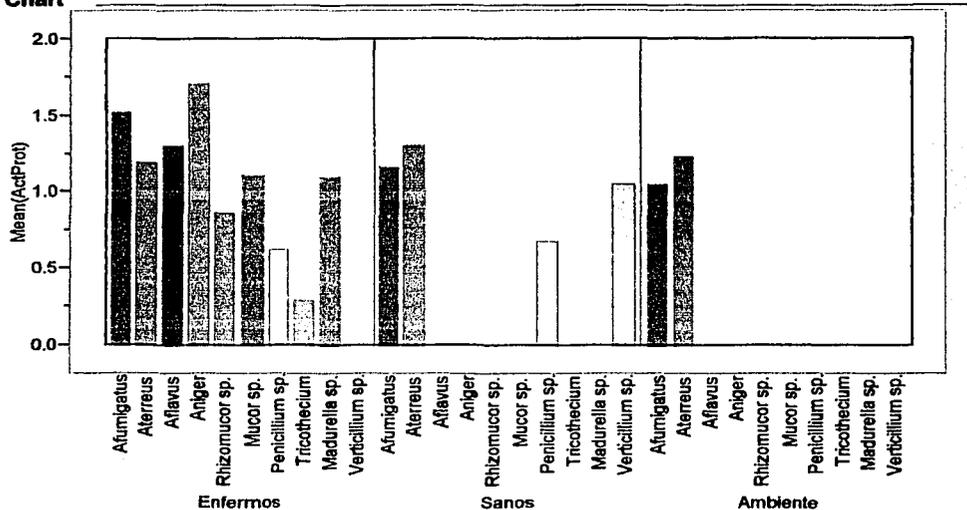


FIGURA 7.

Resultados obtenidos de la medición de la actividad proteolítica producida por cada hongo en los diferentes medios.

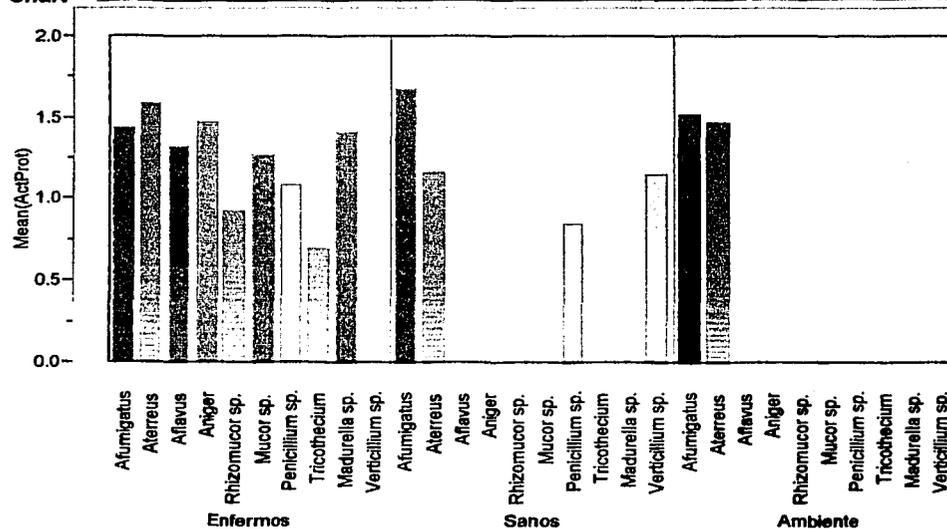
SDA 2%

Chart



SDA 4%

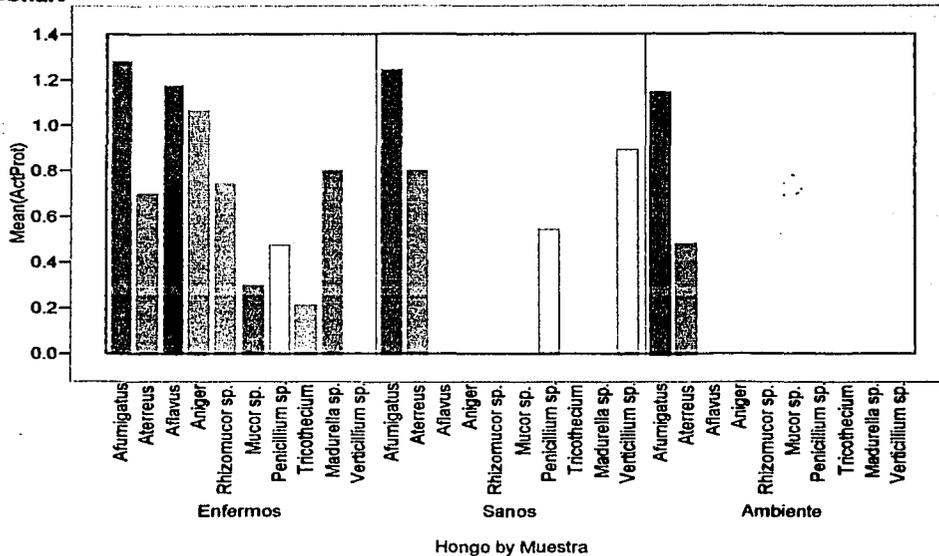
Chart



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

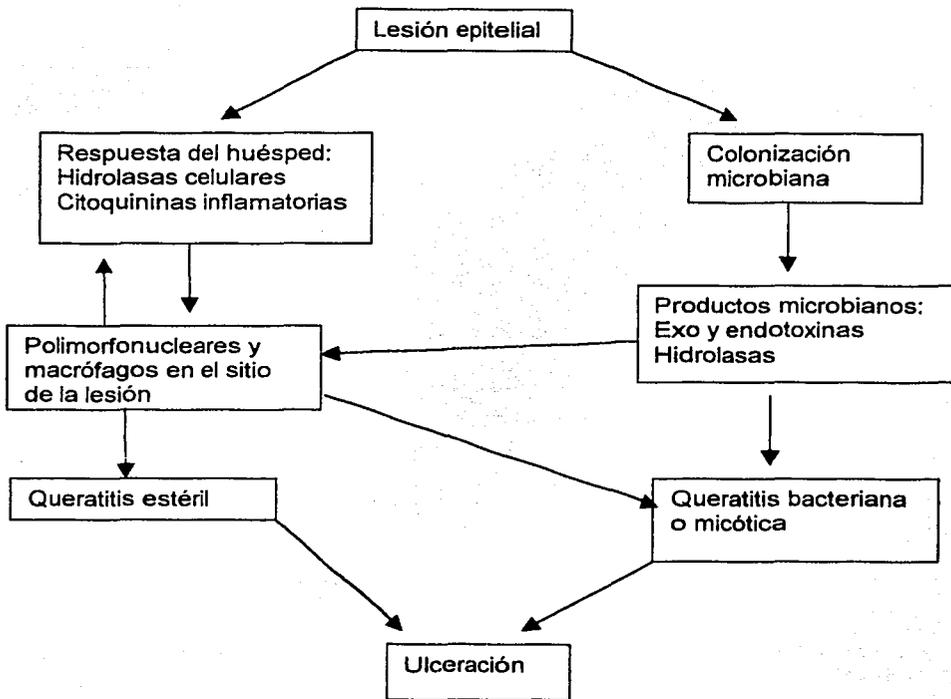
**Czapek
Chart**



CUADROS.

CUADRO I.

Cambios bioquímicos y moleculares que ocurren durante una ulceración corneal:



Barnett K.: Color Atlas and text of equine ophthalmology.

CUADRO 2

Mecanismos de reparación corneal:

Estructura	Mecanismo de reparación	Tiempo	Notas clínicas
Epitelio	Migración y diferenciación de células adyacentes basales	24-72 horas	Las células basales conjuntivales sellan defectos perilímbricos
Membrana basal	Regeneración de las células basales	6-8 semanas	El nuevo epitelio es pobremente adherente al estroma durante la regeneración
Estroma Estadio 1	Edema local	1-2 horas	
Estadio 2	Migración de células mononucleares, aumento local de la actividad de hidrolasas	1-48 horas	La actividad enzimática resulta en la separación rápida del estroma
Estadio 3	Fibroblastos o queratocitos transformados producen nuevo colágeno	Más de 2 días	Uso de corticoesteroides para controlar fibrosis y promover la transparencia corneal
Estadio 4	Maduración y alineamiento de fibras de colágeno reparadoras	Más de 2-3 semanas	
Membrana de Descemet	Regeneración desde el endotelio; cuando hay grandes defectos hay proliferación de colágeno desde el estroma		
Endotelio	Migración y alargamiento de células. Capacidad limitada de reparación en el adulto		

CUADRO 3

Reseña de las especies de hongos y de bacterias aislados de ojos de caballos y de su ambiente:

Caballo	Nombre	Hongo ojo	Hongo amb	Bacteria	Ambiente	Condición
1	Chispita	Pen, Trich, A.terr		Bacillus, Coryne	DF	UC
2	Gaviota	A.flavus		Staph	DF	UC
3	Cayman			Moraxella, Pseud	DF	UC
4	Tomás	Pen		Strept, Serratia	Ajusco	UC
5	Saudi	Pen		Enterob	Ajusco	UC
6	Toscana	A. fum, A.terr			Ajusco	UC
7	Farruco			Pseud, Candida	EM	UC
8	Bandida	Mucor, A.flavus			EM	UC
9	Gladiador	A.terr		Enterob	EM	UC
10	Chamizal	A.fum, A.terr			Qro	UC
11	Eficaz	A.niger		Staph	Qro	UC
12	Eclipse	Rizom		Staph, Nocardia	EMP	UC
13	Dan	A.terr			EMP	UC
14	Solotwo	A.terr			Hip	UC
15	Noqueno	A.fum, Pen			UNAM	UC
16	General		A.fumigatus	Steptomycetes, Staph	DF	Sano
17	Clasic		Penicillium	Vibrio, Staph	Qro	Sano
18	Exclusiva		Madurella, A.terr	Staph, Strept	EMP	Sano
19	Pasport	A.terr	A.terr, A.fum	Bacillus	Hip	Sano
20	Alfa	Verticillium	A.terr, Vertic	Acinet, Strept	EM	Sano
21	3030	A.terr, Pen	A.terr, Pen		UNAM	Sano
22	Forrest	Pen, Vertici	A.fumigatus	Coryne	Ajusco	Sano

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 4.

Resultados obtenidos de la determinación de proteínas y de la aplicación de la fórmula para medir la actividad específica de la elastasa:

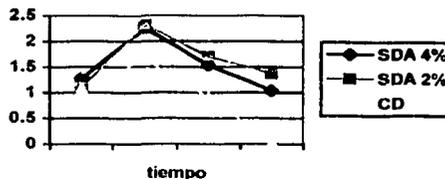
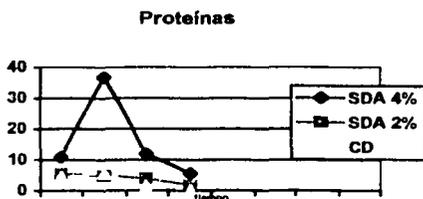
Aspergillus fumigatus 17H3

Paciente enfermo

A 30 °:

	48 hrs. Prot. mg/ml	48 horas act.esp U/ml	72 hrs. Prot.	72 hrs. Act.esp.	96 hrs. prot.	96 hrs. Act.esp	1 sem. prot.	1 sem. Act.esp.
SDA al 4%	10.96	1.28	36.77	2.257	11.93	1.537	5.645	1.035
SDA al 2%	5.48	1.12	4.83	2.31	4.03	1.71	1.77	1.37
CD	4.43	1.06	5.64	1.64	1.483	0.908	0.161	0.0318

Actividad proteolítica

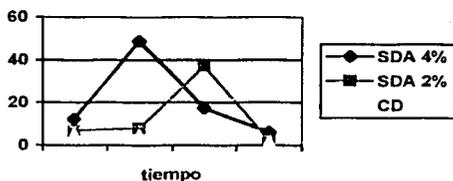


A 37°:

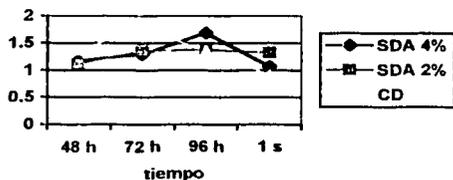
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	48 hrs. Prot. mg/ml	48 horas act.esp U/ml	72 hrs. Prot.	72 hrs. Act.esp.	96 hrs. prot.	96 hrs. Act.esp	1 sem. prot.	1 sem. Act.esp.
SDA al 4%	12.4	1.17	48.87	1.290	17.5	1.69	6.29	1.064
SDA al 2%	7.01	1.12	7.98	1.36	37.17	1.379	2.66	1.32
CD	5.16	1.37	4.83	1.77	5.88	1.35	1.645	0.916

Proteínas



Actividad proteolitica



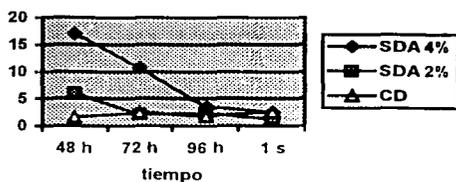
Aspergillus terreus 13H2
Paciente enfermo

A 30°:

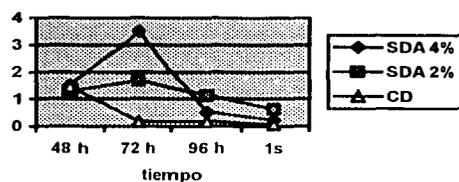
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	17	1.50	10.64	3.49	9.59	0.518	2.475	0.206
SDA al 2%	6.04	1.30	2.12	1.68	2.25	1.13	1.241	0.62
CD	1.53	1.46	2.4	0.161	1.78	0.161	2.5	0.062

Proteínas



Actividad proteolitica



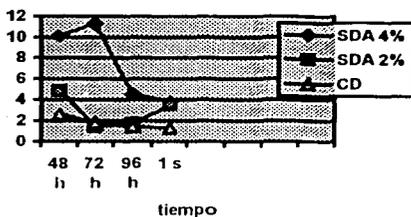
Aspergillus fumigatus 13H1
Medio ambiente

A 37°

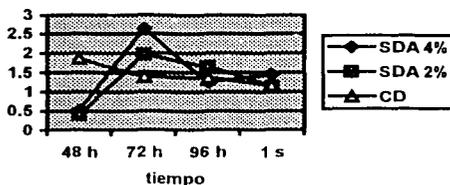
	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	10.08	0.507	11.29	2.64	4.51	1.25	3.70	1.44
SDA al 2%	4.83	0.40	1.40	1.96	1.725	1.64	3.54	1.14
CD	2.58	1.86	1.77	1.4	1.39	1.36	1.25	1.17

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Proteínas



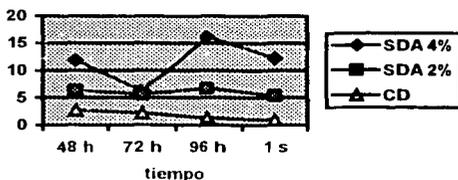
Actividad proteolítica



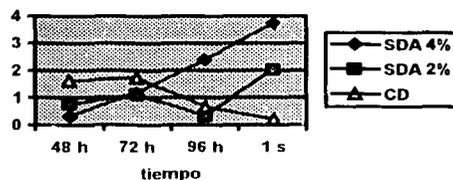
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	11.77	0.314	6.29	1.18	16.12	2.38	12.14	3.72
SDA al 2%	6.37	0.77	5.64	1.12	6.69	0.316	5.36	2.02
CD	2.66	1.622	2.17	1.72	1.290	0.645	0.920	0.195

Proteínas



Actividad proteolítica



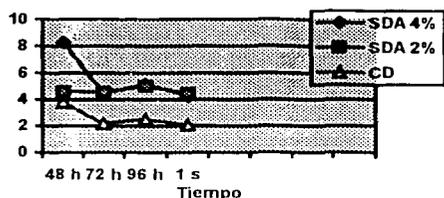
Aspergillus flavus 16H3
Paciente enfermo

A 30°:

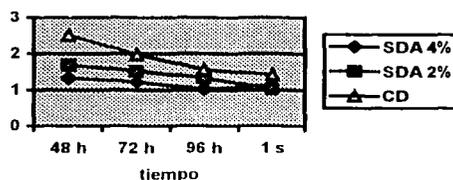
TESIS
FALLA DE ORIGEN

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	8.25	1.33	4.43	1.22	5.16	1.02	4.23	1.12
SDA al 2%	4.62	1.69	4.56	1.52	5.01	1.32	4.46	1.03
CD	3.77	2.51	2.15	1.98	2.47	1.56	2.06	1.42

Proteínas



Actividad proteolítica

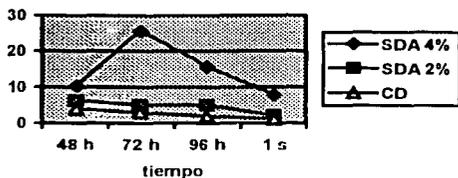


Aspergillus niger 16H4
Paciente enfermo

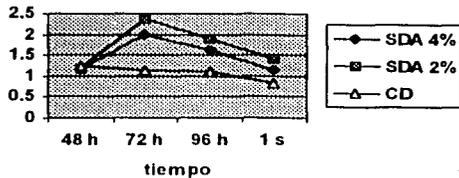
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	10.24	1.18	25.62	1.99	15.61	1.610	7.89	1.13
SDA al 2%	6.12	1.15	4.96	2.37	5.01	1.89	1.98	1.42
CD	3.97	1.24	2.88	1.12	1.79	1.09	1.06	0.810

Proteínas



Actividad proteolítica

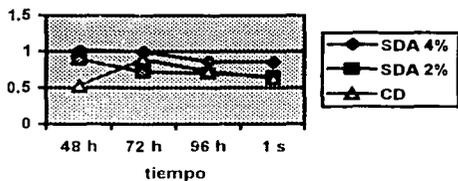


Penicillium sp 11H2
Medio ambiente

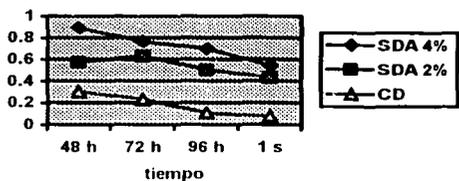
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	1.01	0.89	0.998	0.763	0.857	0.695	0.846	0.540
SDA al 2%	0.891	0.572	0.715	0.630	0.699	0.501	0.651	0.432
CD	0.523	0.300	0.890	0.229	0.719	0.107	0.627	0.074

Proteínas



Actividad proteolítica



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

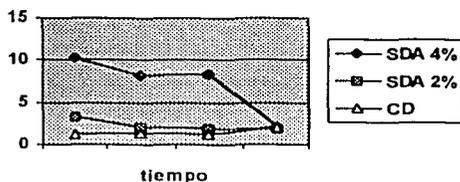
Aspergillus terreus 6H2

Medio ambiente:

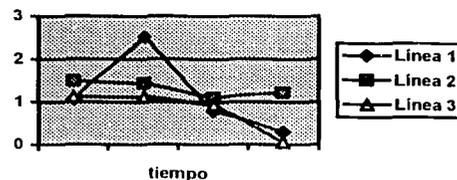
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. Act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	10.2	1.05	8.26	2.52	8.33	0.789	1.99	0.304
SDA al 2%	3.28	1.49	2.01	1.43	1.96	1.09	1.865	1.22
CD	1.26	1.12	1.345	1.12	1.155	0.92	2.1	0.057

Proteínas



Actividad proteolítica



Rhizomucor sp. 7H1

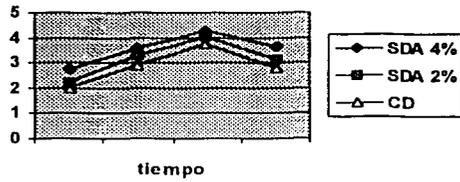
Paciente enfermo

A 30°:

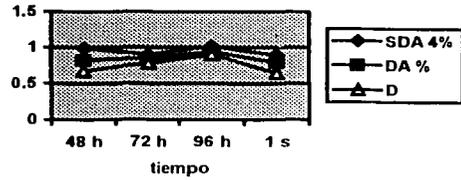
	48 hrs. Prot.	48 hrs. Act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	2.75	0.989	3.59	0.897	4.26	1.02	3.62	0.896
SDA al 2%	2.22	0.823	3.29	0.842	4.04	0.936	3.14	0.789
CD	1.97	0.673	2.88	0.780	3.76	0.902	2.81	0.642

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Proteínas



Actividad proteolítica

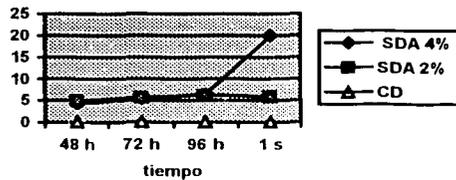


Mucor sp. 5H1
Paciente enfermo

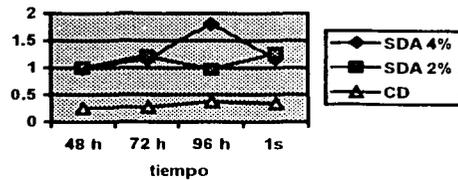
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act. esp	72 hrs prot	72 hrs act. esp	96 hrs prot.	96 hrs act. esp	1 sem prot.	1 sem act. esp
SDA al 4%	4.26	0.986	5.52	1.15	6.45	1.8	19.91	1.16
SDA al 2%	4.91	0.997	5.61	1.21	6.20	0.967	5.88	1.26
CD	-1.52	0.25	-2.17	0.27	-9.83	0.366	-8.24	0.331

Proteínas



Actividad proteolítica

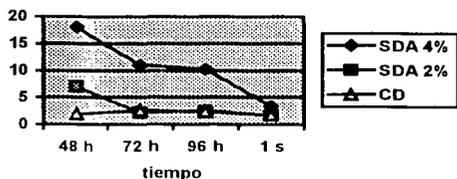


Aspergillus terreus 15H1
Paciente enfermo

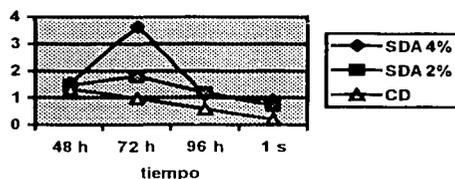
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	18	1.56	10.98	3.62	10.21	1.09	3.42	0.907
SDA al 2%	7.02	1.47	2.21	1.79	2.46	1.19	1.68	0.71
CD	1.90	1.32	2.51	0.98	2.30	0.57	1.71	0.191

Proteínas



Actividad proteolítica

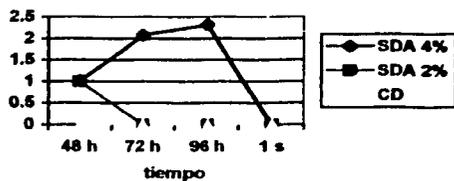


Penicillium sp. 1H1
Paciente enfermo

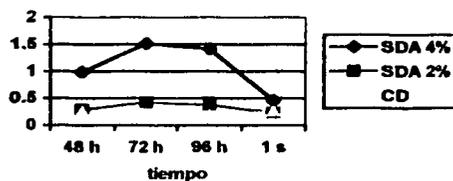
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	1.02	0.987	2.08	1.52	2.32	1.41	-9.51	0.46
SDA al 2%	0.999	0.289	-4.87	0.423	-5.56	0.378	-16.04	0.231
CD	-2.90	0.258	-2.24	0.213	-2.19	0.195	-1.37	0.267

Proteínas



Actividad proteolítica

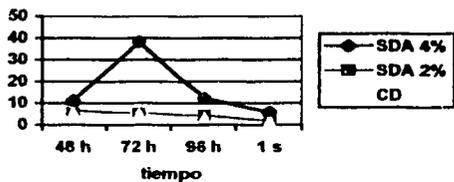


Aspergillus fumigatus 6H1
Paciente enfermo

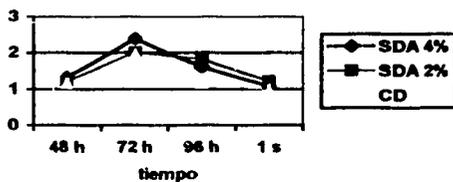
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	11.26	1.32	38.26	2.40	12.42	1.610	5.980	1.079
SDA al 2%	6.71	1.22	5.29	2.02	4.36	1.82	1.96	1.22
CD	5.22	1.14	4.97	1.96	3.26	1.14	1.21	0.989

Proteínas



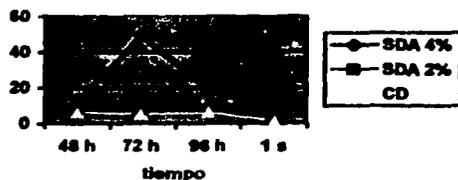
Actividad proteolítica



A 37°:

TEL. 600
FALLA DE ORIGEN

Proteínas



Actividad proteolítica



Penicillium sp. 2H1
Paciente enfermo

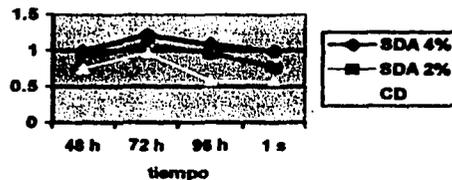
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	1.12	0.999	2.17	1.22	1.999	1.08	1.37	0.991
SDA al 2%	1.01	0.897	1.57	1.09	1.13	0.967	1.02	0.796
CD	0.918	0.756	1.32	0.976	1.05	0.572	0.985	0.580

Proteínas



Actividad proteolítica

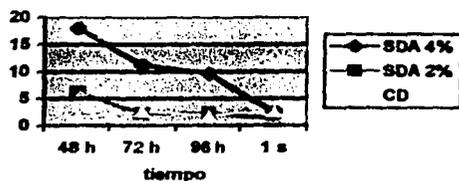


***Aspergillus terreus* 8H1**
Medio ambiente

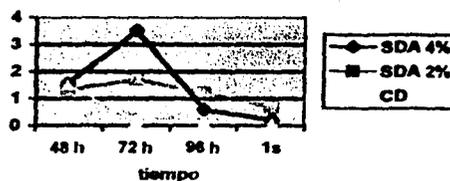
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. Act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	18	1.56	11.2	3.52	9.62	0.612	2.61	0.214
SDA al 2%	6.12	1.32	2.24	1.71	2.31	1.21	1.32	0.69
CD	1.62	1.51	2.6	0.174	1.90	0.165	2.6	0.102

Proteínas



Actividad proteolítica



***Aspergillus flavus* 13H3**
Paciente enfermo

A 30°:

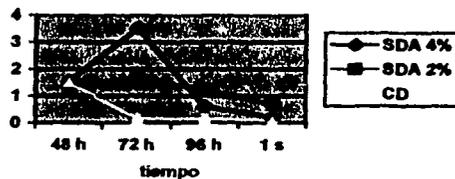
	48 hrs. Prot.	48 hrs. Act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	18	1.56	11.2	3.52	9.62	0.612	2.61	0.214
SDA al 2%	6.12	1.32	2.24	1.71	2.31	1.21	1.32	0.69
CD	1.62	1.51	2.6	0.174	1.90	0.165	2.6	0.102

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Proteínas



Actividad proteolítica

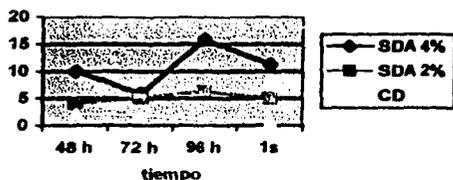


Aspergillus fumigatus 9H1
Medio ambiente

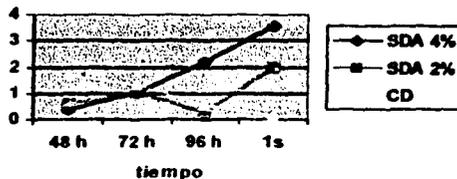
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	10.02	0.404	5.91	1.05	15.91	2.21	11.21	3.56
SDA al 2%	4.14	0.59	5.14	1.02	6.32	0.298	5.02	1.97
CD	2.21	1.71	2.01	1.31	1.189	0.541	0.898	0.187

Proteínas



Actividad proteolítica

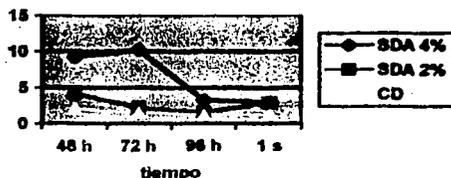


A 37°:

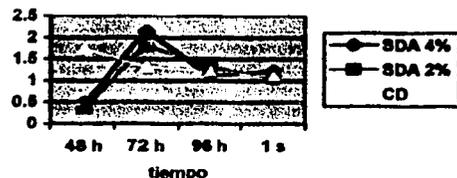
TEMA 10
FALLA DE ORIGEN

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	9.26	0.491	10.23	2.14	3.28	1.12	2.96	1.22
SDA al 2%	4.21	0.38	2.21	1.82	1.602	1.31	2.91	1.07
CD	2.14	1.74	1.59	1.32	1.29	1.22	1.25	1.12

Proteínas



Actividad proteolítica

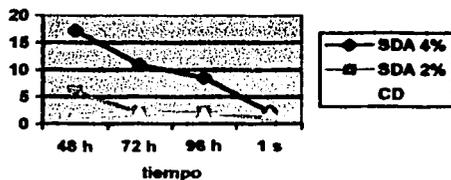


***Aspergillus terreus* 10H1**
Paciente enfermo

A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	17.2	1.48	10.97	3.21	8.58	0.598	2.34	0.210
SDA al 2%	5.91	1.22	2.14	1.58	2.10	1.10	1.11	0.53
CD	1.58	1.47	2.21	0.182	1.81	0.162	2.1	0.98

Proteínas



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Actividad proteolítica

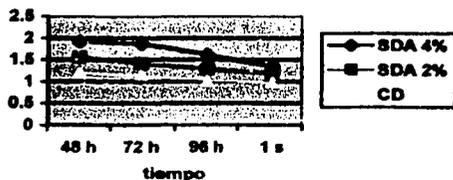


Tricothecium roseum 1H2 Paciente enfermo

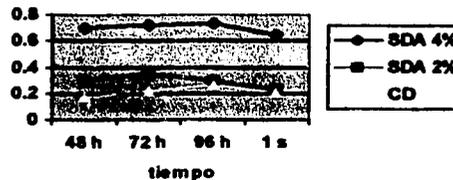
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	1.92	0.699	1.87	0.718	1.62	0.734	1.34	0.651
SDA al 2%	1.56	0.300	1.41	0.351	1.29	0.297	1.18	0.234
CD	1.20	0.173	1.13	0.217	1.02	0.262	0.987	0.204

Proteínas



Actividad proteolítica



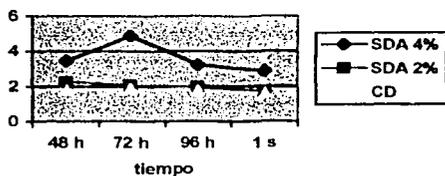
Madurella sp. 10H2 Paciente enfermo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

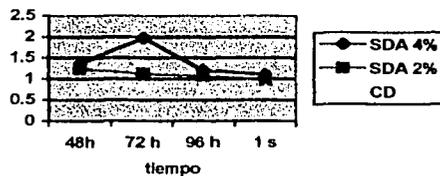
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act. esp	72 hrs prot	72 hrs act. esp	96 hrs prot.	96 hrs act. esp	1 sem prot.	1 sem act. esp
SDA al 4%	3.45	1.36	4.87	1.97	3.23	1.21	2.89	1.10
SDA al 2%	2.24	1.24	2.06	1.12	1.98	1.07	1.73	0.971
CD	1.79	0.810	1.89	0.844	1.75	0.820	1.63	0.747

Proteínas



Actividad proteolítica



Verticillium sp. 9H2
Medio ambiente

A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act. esp	72 hrs prot	72 hrs act. esp	96 hrs prot.	96 hrs act. esp	1 sem prot.	1 sem act. esp
SDA al 4%	2.23	1.10	2.47	1.19	2.52	1.28	2.21	1.05
SDA al 2%	2.14	1.04	2.41	1.19	2.06	1.006	1.91	0.976
CD	1.73	0.824	1.82	0.916	1.97	0.935	1.89	0.923

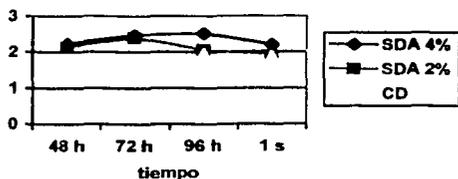
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Verticillium sp. 9H2
Medio ambiente

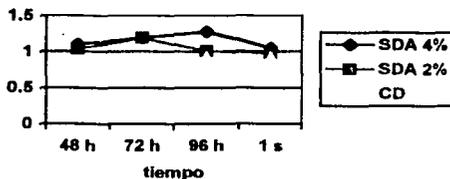
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	2.23	1.10	2.47	1.19	2.52	1.28	2.21	1.05
SDA al 2%	2.14	1.04	2.41	1.19	2.06	1.006	1.91	0.976
CD	1.73	0.824	1.82	0.916	1.97	0.935	1.89	0.923

Proteínas



Actividad proteolítica

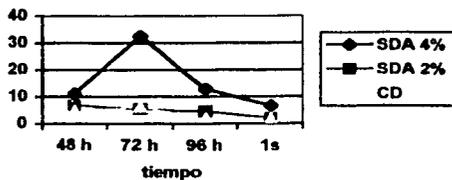


Aspergillus fumigatus 1H3
Paciente enfermo

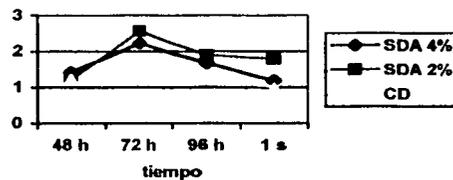
A 30°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	11.21	1.42	32.54	2.23	12.90	1.678	6.59	1.189
SDA al 2%	6.94	1.23	5.24	2.57	4.56	1.90	1.98	1.79
CD	4.98	1.24	5.89	1.72	2.29	1.19	1.98	0.997

Proteínas



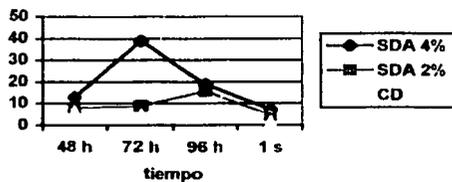
Actividad proteolítica



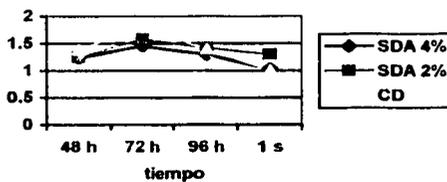
A 37°:

	48 hrs. Prot.	48 hrs. act.esp	72 hrs prot	72 hrs act.esp	96 hrs prot.	96 hrs act.esp	1 sem prot.	1 sem act.esp
SDA al 4%	12.91	1.24	38.79	1.456	18.91	1.29	7.23	1.032
SDA al 2%	8.19	1.25	8.92	1.58	15.67	1.42	4.56	1.30
CD	6.21	1.39	4.91	1.81	5.98	1.39	1.715	1.016

Proteínas



Actividad proteolítica



CUADRO 5

Proporción real entre las proteínas y la actividad proteolítica de la elastasa.

A las 48 horas:

Hongo	SDA 2%	SDA 4%	Czapek Dox
Aspergillus fumigatus a 30° Enfermo 17H3	20.4	11.67	23.9
Aspergillus fumigatus a 37° Enfermo 17H3	15.9	9.43	26.55
Aspergillus terreus a 30° Enfermo 13H2	21.5	8.82	95.42
Aspergillus fumigatus a 37° Medio ambiente 13H1	8.28	5.02	72.09
Aspergillus fumigatus a 30° Medio ambiente 13H1	12.08	2.66	60.90
Aspergillus flavus a 30° Enfermo 16H3	36.58	16.12	66.5
Aspergillus niger a 30° Enfermo 16H4	18.79	11.52	31.23
Penicillium sp. Medio ambiente a 30° 11H2	64.19	88.11	57.36
Aspergillus terreus a 30° Medio ambiente 6H2	45.4	10.2	88.8
Rhizomucor a 30° Enfermo 7H1	37.07	35.9	34.16
Mucor a 30° Enfermo 5H1	20.30	23.14	16.44

Aspergillus terreus 15H1 a 30°	20.94	8.6	69.47
Penicillium sp. a 30° Enfermo 1H1	28.92	96.76	8.89
Aspergillus fumigatus 6H1 Enfermo a 30°	18.18	11.72	21.83
Aspergillus fumigatus 6H1 Enfermo a 37°	15.6	9.39	22.8
Penicillium sp. 2H1 a 30° Enfermo	88.8	89.19	82.35
Aspergillus terreus 8H1 Medio ambiente a 30°	21.5	8.6	93.2
Aspergillus flavus 13H3 Enfermo a 30°	35.9	16.9	67.9
Aspergillus fumigatus 9H1 Medio ambiente A 30°	14.25	4.03	77.37
Aspergillus fumigatus 9H1 Medio ambiente a 37°	9.02	5.30	81.3
A.terreus 10H1 Enfermo a 30°	20.6	8.6	93
Tricothecium roseum Enfermo a 30° 1H2	19.23	36.40	14.41
Madurella sp. 10H2 Enfermo a 30°	55.35	39.42	45.25
Verticillium sp. Ambiente a 30° 9H2	48.59	49.32	47.63
A fumigatus 1H3 Enfermo a 30°	17.7	12.66	24.89
A fumigatus 1H3 Enfermo a 37°	15.26	9.6	22.38

A las 72 horas:

Hongo	SDA 2%	SDA 4%	Czapek Dox
Aspergillus fumigatus a 30° Enfermo 17H3	47.8	6.11	29.07
Aspergillus fumigatus a 37° Enfermo 17H3	17.04	2.63	36.64
Aspergillus terreus a 30° Enfermo 13H2	79.2	32.8	6.7
Aspergillus fumigatus a 37° Medio ambiente 13H1	81.6	23.38	79
Aspergillus fumigatus a 30° Medio ambiente 13H1	19.85	18.75	79.26
Aspergillus flavus a 30° Enfermo 16H3	33.3	27.5	92.09
Aspergillus niger a 30° Enfermo 16H4	47.78	7.76	38.88
Penicillium a 30° Ambiente 11H2	88.11	76.45	25.73
Aspergillus terreus 30° 6H2 Ambiente	71.14	30.50	83.2
Rhizomucor a 30° Enfermo 7H1	25.59	24.9	27.08
Mucor a 30° Enfermo 5H1	21.56	20.19	12.4
15H1 Aspergillus terreus a 30° Enf	80.99	32.96	39.04
Penicillium a 30° Enfermo 1H1	8.68	73.07	9.50
Aspergillus fumigatus 6H1 Enfermo a 30°	38.1	6.27	39.43

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aspergillus fumigatus 6H1 Enfermo a 37°	17.9	2.6	35.8
Penicillium sp. a 30° 2H1 Enfermo	69.42	56.22	73.93
Aspergillus terreus 8H1 Ambiente a 30°	76.3	31.4	6.6
Aspergillus flavus 13H3 Enfermo a 30°	35.4	28.4	90.9
Aspergillus fumigatus 9H1 Medio ambiente a 30°	19.8	17.76	65.17
Aspergillus fumigatus 9H1 Medio ambiente a 37°	82.3	20.9	83
Aspergillus terreus 10H1 Enfermo a 30°	73.8	29.2	8.23
Tricothecium roseum Enfermo a 30° 1H2	24.89	38.39	19.20
Madurella sp. 10H2 Enfermo a 30°	54.36	40.45	44.65
Verticillium sp. Ambiente a 30° 9H2	49.37	48.17	50.32
A fumigatus 1H3 Enfermo a 30°	49	6.85	29.20
A fumigatus 1H3 Enfermo a 37°	17.71	3.75	36.86

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A las 96 horas:

Hongo	SDA 2%	SDA 4%	Czapek Dox
Aspergillus fumigatus a 30° Enfermo 17H3	42.4	12.8	61.22
Aspergillus fumigatus a 37° Enfermo 17H3	3.70	9.65	22.90
Aspergillus terreus a 30° Enfermo 13H2	50.22	5.40	9.04
Aspergillus fumigatus a 37° Ambiente 13H1	95.07	27.71	97.8
Aspergillus fumigatus a 30° Ambiente 13H1	4.72	14.76	50
Aspergillus flavus a 30° Enfermo 16H3	26.3	19.7	63.15
Aspergillus niger a 30° Enfermo 16H4	37.72	10.31	60.89
Penicillium sp. 30° Ambiente 11H2	71.67	81.09	14.88
Aspergillus terreus a 30° 6H2 Ambiente	55.61	9.47	79.6
Rizomucor a 30° Enfermo 7H1	23.16	23.9	23.98
Mucor a 30° Enfermo 5H1	15.5	27.9	3.72
Aspergillus terreus a 30° Enfermo 15H1	48.37	10.67	24.78
Penicillium a 30° Enfermo 1H1	6.79	60.77	9.19
Aspergillus fumigatus 6H1 Enfermo a 30°	41.7	12.96	34.9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aspergillus fumigatus 6H1 Enfermo a 37°	3.7	9.28	24.7
Penicillium sp. a 30° 2H1 Enfermo	85.57	54.02	54.47
Aspergillus terreus 8H1 Ambiente a 30°	52.3	6.3	8.6
Aspergillus flavus 13H3 Enfermo a 30°	56.28	9.52	87.7
Aspergillus fumigatus 9H1 Medio ambiente a 30°	4.71	13.8	45.5
Aspergillus fumigatus 9H1 Medio ambiente a 37°	81.7	34.1	94.5
Aspergillus terreus 10H1 Enfermo a 30°	52.3	6.96	8.9
Tricothecium roseum Enfermo a 30° 1H2	23.02	45.30	25.68
Madurella sp. 10H2 Enfermo a 30°	54.04	37.46	46.85
Verticillium sp. Ambiente a 30° 9H2	48.83	50.79	47.46
A fumigatus 1H3 Enfermo a 30°	41.66	13	51.96
A fumigatus 1H3 Enfermo a 37°	9.06	6.82	23.24

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1 semana:

Hongo	SDA 2%	SDA 4%	Czapek Dox
Aspergillus fumigatus a 30° Enfermo 17H3	77.4	18.3	19.7
Aspergillus fumigatus a 37° Enfermo 17H3	49.62	16.91	55.68
Aspergillus terreus a 30° Enfermo 13H2	49.9	8.32	2.48
Aspergillus fumigatus a 37° Ambiente 13H1	32.20	38.91	93.6
Aspergillus fumigatus a 30° Ambiente 13H1	37.6	30.6	21.19
Aspergillus flavus a 30° Enfermo 16H3	23.09	26.4	68.93
Aspergillus niger a 30° Enfermo 16H4	71.71	14.32	76.41
Penicillium a 30° Ambiente 11H2	66.35	63.82	11.80
Aspergillus terreus a 30° 6H2 Ambiente	65.4	15.27	2.7
Rizomucor a 30° Enfermo 7H1	25.12	24.7	22.8
Mucor a 30° Enfermo 5H1	21.42	5.82	4.01
Aspergillus terreus a 30° Enfermo 15H1	42.26	26.52	11.16
Penicillium a 30° Enfermo 1H1	1.44	4.83	19.48
Aspergillus fumigatus 6H1 Enfermo a 30°	62.2	17.8	81.7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Penicillium 2H1 Enfermo a 30°	78.03	72.33	58.88
Aspergillus terreus 8H1 Ambiente a 30°	52.2	8.19	3.92
Aspergillus flavus 13H3 Enfermo a 30°	67.9	20	3.62
Aspergillus fumigatus 9H1 Medio ambiente a 30°	39.2	31.7	20.8
Aspergillus fumigatus 9H1 Medio ambiente a 37°	36.76	41.21	89.6
Aspergillus terreus 10H1 Enfermo a 30°	47.7	8.97	46.6
Tricothecium roseum Enfermo a 30° 1H2	19.83	48.58	20.66
Madurella sp. 10H2 Enfermo a 30°	56.12	38.06	45.82
Verticillium sp. Ambiente a 30° 9H2	51.09	47.51	48.83
A fumigatus 1H3 Enfermo a 30°	90.40	18	50.35
A fumigatus 1H3 Enfermo a 37°	28.50	14.27	59.24

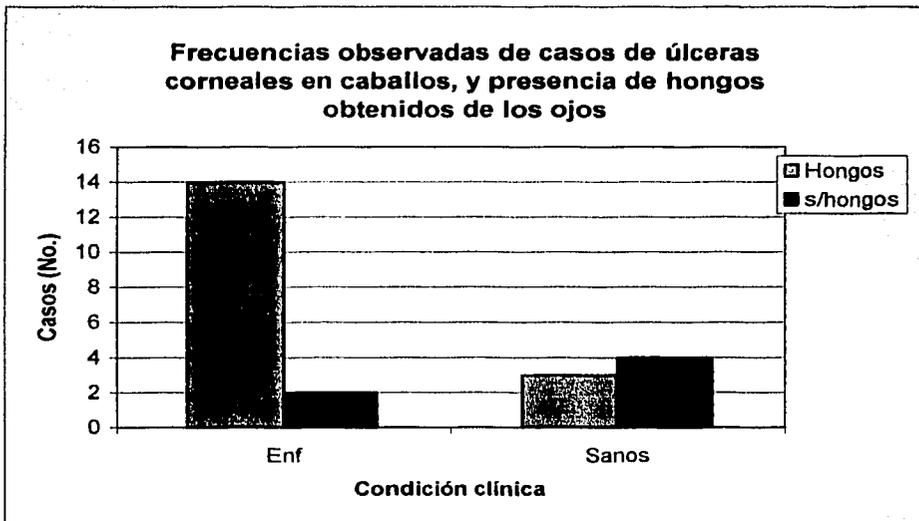
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 6.

Frecuencias de los casos y presencia de hongos:

Observados	Enf	Sanos	Esperados	Enf	Sanos
Hongos		14	3	17	11.826087
s/hongos		2	4	6s/hongos	4.1739130
		16	7	23	1.8260869
					5.0332633
RR	2.47058824			Ji	1
Prevalencia	0.69565217				
c/hongos	0.73913043				
	0.875				
Observados	Enf	Sanos			
Hongos		15	2	17	0.00332848
s/hongos		1	5	6	
		16	7	23	
Observados	Enf	Sanos			
Hongos		16	1	17	6.9343E-05
s/hongos		0	6	6	
		16	7	23	
Observados	Enf	Sanos			
Hongos		14	3	17	0.04160599
s/hongos		2	4	6	
		16	7	23	
					0.04500381

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PIE DE PÁGINAS:

- a Xilacina, Rompun, Bayer Animal Health, Shawnee Mision, KS
- b Lidocaína Laboratorios PISA
- c Finoff transilluminator, Durr Fillauer Medical, Jacksonville Fl
- d Lámpara de hendidura portátil SL-14, Kowa Company Ltd., Tokio, Japón
- e Welch Allyn binocular indirect headset, Skaneateles Falls, NY
- f Fluor-I-Strip, Ayerst Laboratories Inc. Philadelphia, PA
- g Rose Bengal Sterile Ophthalmic Strips, Akorn Inc., Buffalo Grove, IL
- h Elastina rojo-congo Sigma Aldrich número de catálogo E00502
- i Centriprep Centrifugal filter devices, YM-30 MW. Millipore Corporation, USA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO.

Medios de cultivo:

- Saboraud Dextrosa Agar (SDA)

Para el cultivo y conservación de hongos

Dextrosa	40 g
Glucosa	40 g
Peptona	20 g
Agar bacteriológico	17 g
Agua destilada	1000 ml

- Czapek Dox

Para cultivar hongos y promover la formación de clamidosporas
Fórmula aproximada para 1000 ml de agua purificada:

Sacarosa	30 g
Nitrato de Na	3 g
Fosfato di potásico	1 g
Sulfato de magnesio	0.50 g
Cloruro de potasio	0.50 g
Sulfato ferroso	0.01 g
Agar	15 g
pH final	7.3 +/- 0.2

- Agar sangre (Infusión de cerebro-corazón)

Para el cultivo de bacterias

Fórmula aproximada para 500 ml de agua destilada:

Agar de infusión cerebro-corazón	26 g
Sangre de borrego	25 ml
Agua destilada	500 ml
pH final	7.4

- Medio Stuart

Para transportar hongos al laboratorio después de la toma de muestras
Fórmula para 100 ml de agua destilada:

Glicerofosfato de sodio	10 g
Tioglicolato de sodio	1 g

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cloruro de calcio	0.1 g
Azul de metileno	0.002 g
Agar	8 g
pH final	7.4 +/- 0.2

- Tween 80 al 1%

Solución para la recuperación de esporas
Fórmula para 100 ml de agua destilada:

Solución tween 80	1 ml
Agua destilada	99 ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1 Samuelson D. Ocular anatomy. In: Gelatt K. editor. Veterinary Ophthalmology. 2001 Chapter 2: 31-35.
- 2 Sisson, Grossman. Anatomía de los animales domésticos. Salvat editores 1985 856-868
- 3 Cook C. Equine corneal disease. Professional forum for veterinarians. San Mateo, CA mayo, 2000
- 4 Gómez-Leal A. Desarrollo del globo ocular y sus anexos. Sociedad Mexicana de Oftalmología. 2000 Capítulos 9 y 13.
- 5 Brooks D: Ophthalmology for the equine practitioner. Editorial Tenton New Media 2002
- 6 Davidson H. Conjunctiva. Comparative anatomy of the eye. Editorial JH Prince 1998
- 7 Brooks D. Equine ophthalmology. In: Gelatt K. editor. Veterinary ophthalmology. 2001 Chapter 30.
- 8 Mauricio H. Determinación de la microflora normal del ojo en equinos del Hipódromo de las Américas. Seminario de Titulación en el área de equinos. 1989
- 9 English R. Immune responses and the eye. In: Gelatt K. editor. Veterinary ophthalmology 2001 Chapter 6
- 10 Andrew S et.al. Posterior lamellar keratoplasty for treatment of deep stromal abscesses in nine horses. Vet. Ophthalmol. 2000, 3: 99-104
- 11 Miller T, et.al. Corneal stromal abscesses in the horse: a review of 24 cases. Equine Vet. Journal 1995, 27(6): 440-447

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-
- 12 Jubb, Kennedy y Palmer. Patología de los animales domésticos. Volumen I. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur 1994
- 13 Johns J, O'Day D. Pharmacological management of keratomycosis. Survey of ophthalmology 1988, 33(3)
- 14 Schoster J. Equine keratomycosis [Página web www.schoster.vetmed.wisc.edu](http://www.schoster.vetmed.wisc.edu) 15 de noviembre del 2001
- 15 Kenyon K. Infections and subsequent healing responses of the equine corneal stroma. The cornea, scientific foundations and clinical practice. 1987: 63-98
- 16 Junqueira L y Carneiro J. Histología básica. Capítulo 4. Salvat editores 1984
- 17 Murphy J et. al. Nutritionally variant streptococci associated with corneal ulcers in horses: 35 cases (1982-1988). Jour. Am. Vet. Assoc. 1990, 5(197): 624-627
- 18 Barton M. Equine keratomycosis. Comp. Am. Col. Vet. Ophtalmol. 1992, 14(5): 936-949
- 19 Grahn B, et.al. Equine keratomycosis: clinical and laboratory findings in 23 cases. Vet. and Comp. Ophthalmol. 1993, 3(1): 1-8
- 20 Harman A, Moore R. Horse vision and an explanation for the visual behavior originally explained by the ramp retina. Equine veterinary Journal 1999, 31 (5): 384-390
- 21 Moore C. Ocular microbial isolates from two groups of Southern Wisconsin horses. Am. Jour. Vet. Res. 1986, 7: 234-239
- 22 Warner R, Strubbe T. Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. Vet. Ophthalmol. 2000, 3: 111-119

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-
- 23 Hendrix D, et. al. Keratomycosis in horses caused by *Cylindrocarpon destructans*. Vet. And Comp. Ophthalmol. 1996, 6(4): 252-257
- 24 Zaidi T, et.al. *Pseudomonas aeruginosa* invades into and survives inside cells during corneal infection. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1993:901-906
- 25 Schaffer J, et. al. Evaluation of activity of selected ophthalmic antimicrobial agents in combination against common ocular microorganisms. Am. Coll. Vet. Res. 1998: 348-353
- 26 Nasisse P, et. al. Equine ulcerative keratitis. Veterinary clinics of North America: equine practice. December 1992, 8 (3)
- 27 Brodgen A, Roth J. Virulence Mechanisms of bacterial pathogens. Capítulos 1 y 4. Editorial ASM Press, tercera edición 2000.
- 28 Rebhun W. Diagnosis and treatment of Equine Uveitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1989, 175: 72-78
- 29 Brooks D, Andrew S. Ulcerative keratitis. Vet.Ophthalmol. 2000, 3: 121-125
- 30 Johnson C, Hanson R. Corneal ulceration in athletic horses. Sports medicine program newsletter. Otoño, 1997
- 31 Blair M., Render J. Granulocyte macrophage colony stimulating factor: effect on corneal wound healing. Vet. and Comp. Ophthalmol. 1997, 7 (3): 168-172
- 32 Pier G. Ocular mucus modulates *Pseudomona aeruginosa* adherence to both intact and injured cornea. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1993 34:844
- 33 Hanna C. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. Arch. Ophthalmol. 1980, 64:536-539

-
- 34 Slansky H. Collagenase in corneal ulcerations. Arch. Ophthal. 1996, 82
- 35 Neaderland M, Riis R. Healing of experimentally produced corneal ulcers in horses. Am. Coll. Vet. Ophthal. 1990, 567-571
- 36 Ball M. Equine fungal keratitis. Equine Compendium. February 2000, 182-185
- 37 Carlton W and McGauin D. Thomson's Special Veterinary pathology. Editorial Mosby Segunda edición 2000
- 38 Welch N.C, Betts D.M. Analisis of antiangiogenic activity of fungi isolated from clinical cases of equine keratomycosis. Vet. Ophthalmol. 2000, 3:145-152
- 39 Glaze M. Ocular diseases. In: Robinson editor. Current therapy in equine medicine. 1999, 2: 450-456
- 40 Piñón A. Utilización de bombas de infusión para una medicación continua en el tratamiento de las úlceras corneales de los equinos. Tesis profesional FMVZ-UNAM 2001
- 41 Sumano H y Ocampo L. Farmacología Veterinaria. Editorial Trillas 1995
- 42 Williams M and Pascoe J. Systemic effects of topical and subconjunctival ophthalmic atropine in the horse. Vet. Ophthalmol. 2000, 3:193-199
- 43 Shell W. Ophthalmic drug delivery systems. Survey of Ophthalmology 1994, 29:117-128
- 44 Sweeny R and Irby L. Topical treatment of Pseudomonas sp. infected corneal ulcers in the horse Jour. Am.Vet. Assoc. 1996, 5 (209): 953-957

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-
- 45 Schmotzer B, Dice F. Evaluation of a continuous flush apparatus for topical ocular medications in the horse. Proceedings Am. Coll. Vet. Ophthalm. 1986, 4 (2) 123-128
- 46 Bonifaz A. Micología Médica Básica. Editorial Méndez Cervantes de México. 1998, 277-300
- 47 Moore C. Clinical microbiology In: Gelatt editor. Veterinary Ophthalmology 2001 Capítulo 7
- 48 Samson R y Pitt I. Integration on modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers 2002
- 49 Kothary H, Chase y MacMillan. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis. Infection and Immunity. Jan, 1994, 320-325
- 50 Brooks D. Equine ophthalmology Convention Proceedings AAEP Orlando, Florida 2002
- 51 García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. UNAM Instituto de Geografía 1973
- 52 Schmidt G. Ocular diseases. En Robinson editor. Current therapy in equine medicine. 1999, 3: 377-382
- 53 Barnett K. Color atlas and text of equine ophthalmology. Editorial Mosby-Wolf 1995, 112-128
- 54 Greve S. Equine eye examination techniques . Equine practice 1995, 17 (9): 7-14
- 55 Leisegang y Robinson: Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology CUMTECH American Society for Microbiology editors 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-
- 56 Segundo ZC. Manual teórico-práctico (prácticas y alternativas) para QFB. Tesis de licenciatura 1991 FESC-UNAM
- 57 Perlmann: Methods of enzymology. En Proteolytic enzymes. Editorial London Academic Press. 1970, 19
- 58 García J. y Vicedo A. Capacidad inhibitoria de la actividad proteolítica del elhibin. Rev. Cubana Invest. Biomed 2000, 19 (3): 172-177
- 59 Barnett A. Methods of Enzymology In Proteolytic enzymes Editorial London Academic Press. 1981, 80:26-36
- 60 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72:254-284
- 61 Miller W.: Evaluation and management of corneal ulcerations: a systematic approach. Clinical techniques in animal practice 2001, 16 (1): 51-57
- 62 Denning DW y Elliot J.: Temperature-dependent expression of elastase in *Aspergillus* species. Journal of Med. and Vet. Mycology 1993, 31: 455-458
- 63 Deacon J. Introduction to modern mycology. Capítulos 2, 3 y 4, 1996, 2nd edition
- 64 Hamor R. y Whelan N. Equine infectious keratitis. Veterinary Clinics of North America: Equine practice. 1999, 15 (3)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN