



## APOPTOSIS DE LOS QUERATOCITOS DESPUÉS DE UN CROSS-LINKING DE COLÁGENO UTILIZANDO UN TRATAMIENTO DE RIBOFLAVINA/UVA

Dr. Gregor Wollensak, Prof. Eberhard Spoerl, Prof. Michaela Wilsch, y Prof. Theo Seiler

### Abstract

#### Propósito:

El tratamiento combinado de riboflavina/UVA que induce los cross-links de colágeno en la córnea, ha demostrado un incremento en la rigidez biomecánica de la córnea y ha sido utilizado exitosamente en el tratamiento del queratocono progresivo. El presente estudio se llevó a cabo para investigar el posible efecto citotóxico del tratamiento combinado de riboflavina/UVA en los queratocitos in vivo.

#### Métodos:

Se trataron 34 conejos blancos de Nueva Zelanda con solución de riboflavina al 0,1% e irradiaciones de superficie con rayos UVA con un rango de 0,75 a 4 mW/cm<sup>2</sup> (1,35-7,2J/cm<sup>2</sup>), durante 30 minutos. Se mató a los animales a las 4 (n = 6) ó 24 (n = 28) horas postoperatorias.

En el grupo de control, los ojos se sometieron únicamente a una limpieza de partículas epiteliales. Se evaluaron las córneas de los ojos enucleados en secciones histológicas rutinarias. Adicionalmente, se utilizaron la técnica TUNEL y de microscopía electrónica de transmisión, para detectar la apoptosis de los queratocitos.

#### Resultados:

En los ojos de control con limpieza epitelial únicamente, se encontraron los queratocitos apoptóticos en el estroma corneal de 50  $\mu$ m a las 4 horas postoperatorias. Sin embargo, la apoptosis inducida con riboflavina/UVA, solo fue visible en los ojos de conejo enucleados a las 24 horas postoperatorias. En estos ojos encontramos apoptosis de queratocitos a una profundidad estromal variable, dependiendo de la irradiación UVA aplicada. Se pudo deducir una irradiación UVA citotóxica para los queratocitos en el rango de 0,5 – 0,7 mW/cm<sup>2</sup>.

#### Conclusiones:

El tratamiento de riboflavina/UVA provoca un daño de queratocitos dependiendo de la dosis, que puede esperarse que en los humanos sea a una profundidad de 300  $\mu$ m, utilizando una dosis de rayos UVA de 5,4 J/cm<sup>2</sup>. Deben realizarse más estudios para examinar la repoblación de queratocitos y excluir posibles secuelas adversas de la pérdida de queratocitos, como la cicatrización estromal o el adelgazamiento.

**Palabras clave:** irradiación UVA, cross-linking, queratocitos, riboflavina, córnea, apoptosis El cross-linking de colágeno en la córnea utilizando UVA y riboflavina fotosensibilizadora, fue desarrollado recientemente para el fortalecimiento biomecánico de la córnea. En un estudio piloto prospectivo incluyendo 22 pacientes con queratocono progresivo y un período de seguimiento de 4 años, pudo detenerse la progresión del queratocono en todos los ojos tratados. Incluso se alcanzó una regresión con una reducción de las lecturas queratométrica máximas de 2 D en el 70% de los pacientes. La transparencia corneal y del cristalino y la densidad celular del endotelio, permanecieron sin cambios.<sup>1</sup> En las mediciones de tensión/presión de la córnea humana, de conejo y de cerdo<sup>2-4</sup>, pudimos demostrar un incremento significativo de la rigidez biomecánica. Después de la exposición a la colagenólisis, que juega un papel en la ulceración del queratocono y corneal, se encontró un retraso significativo en la disolución de tejido inducido por las enzimas de 8 días en las córneas sometidas al crosslinking, indicando un incremento en la resistencia de digestión de enzimas.<sup>5</sup> Otras aplicaciones del nuevo método de cross-linking son los procesos de

“melting” corneal y el campo de la Cirugía Refractiva, como la prevención de queratectasia después del LASIK en miopes altos, o la regresión del efecto refractivo.<sup>7</sup>

Como parte de una extensa evaluación de seguridad de este nuevo tratamiento, hemos llevado a cabo el siguiente estudio experimental para evaluar el posible daño a los queratocitos después del tratamiento combinado de riboflavina/UVA.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Diseño del Estudio**

Se utilizaron 38 ojos de 38 conejos blancos de Nueva Zelanda hembra, con un peso entre 2 y 2,5 kilos. 34 ojos de 34 conejos se trataron con abrasión epitelial central, riboflavina y diversas irradiaciones UVA (ver más abajo). 4 ojos de control se trataron únicamente con abrasión corneal. Los animales se dividieron en 2 subgrupos, dependiendo del intervalo de tiempo postoperatorio de 4 ó 24 horas respectivamente:

1. 6 conejos se irradiaron con una superficie de irradiación UVA de 0,75 a 4 mW/cm<sup>2</sup> (0,75, 1,5, 3, y 4 mW/cm<sup>2</sup>) (**Tabla 1**). Estos animales también fueron matados a las 4 horas postoperatorias (n = 8).

2. 28 conejos fueron tratados con riboflavina y se irradiaron con una superficie de irradiación UVA de 0,75 a 4 mW/cm<sup>2</sup> (0,75, 1,5, 1,88, 2,25, 2,62, 3 y 4 mW/cm<sup>2</sup>) (**Tabla 1**) y se mataron a los 24 horas postoperatorias. Otros dos conejos se sometieron únicamente a la limpieza de partículas y se mataron a las 24 horas postoperatorias (n = 30).

### **Tratamiento de Cross-linking**

Se aplicó anestesia general con inyección subcutánea de una mezcla de diazepam y atropina (1 mg). Para la premedicación, se utilizaron 1,5 mL de hidroclicloruro ketamine al 10% (35 mg/kg) y 0,5 mL de hidroclicloruro xulazine (5 mg/kg). En cada conejo, sólo el ojo derecho se expuso a la energía de los rayos UVA. Se colocó un blefarostato. Después de la extracción de la porción central de 5 mm del epitelio con un cuchillito creciente despuntado, se aplicó sobre la córnea una gota una solución fotosensibilizadora de riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), compuesta de riboflavina-fosfato al 0,1% y dextrán T-500 al 20%, 5 minutos antes de la irradiación para alcanzar una buena penetración corneal de la solución y también se aplicó cada 5 minutos durante la irradiación. Se irradiaron los ojos con UVA (370 nm) durante 30 minutos, utilizando un diodo UVA doble (Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria) a una distancia de 1 cm de la córnea. Se utilizaron 3 acumuladores de 1,3 V como generadores de energía. Antes del tratamiento, la superficie deseada de irradiación en el rango de 0,75 a 4 mW/cm<sup>2</sup> (**Tabla 1**), se controló con un calibrador de UVA (LaserMate-Q, LASER 2000, Wessling, Alemania) a una distancia de 1 cm y, en caso de haber sido necesario, se regularía con un potenciómetro. Los animales se mataron a las 4 ó 24 horas postoperatorias con anestesia general, utilizando una sobredosis de fenobarbital sódico intravenoso. Todos los procedimientos con los animales fueron aprobados por el comité de ética y conforme a la Resolución de la ARVO sobre el Uso de Animales en la Investigación Oftalmológica y de Visión.

### **Preparación del Tejido**

Se bisecaron los ojos de conejo enucleados a las 4 ó 24 horas postoperatorias. Una mitad se fijó en Formalina neutral al 4% para la microscopía luminosa y la otra mitad se sumergió en glutaraldeído al 2% para la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para la microscopía luminosa, se tiñeron 4  $\mu$ m de secciones de parafina con hemotaxolín-eosin y ácido ZIF periódico (PAS). Se evaluó a los especímenes con un microscopio luminoso de Zeiss (Axioskop) a una magnificación de 40- a 1000-.



**Tabla 1. Profundidad de Pérdida de Queratocitos en Relación con la Irradiación UVA**

Grupo	n	Superficie de Irradiación de UVA (mW/cm <sup>2</sup> )	Profundidad de la Pérdida de Queratocitos (μm)	Irradiación UVA Citotóxica calculada (mW/cm <sup>2</sup> )
1	3	4	350	0,63
2	6	3	300	0,61
3	5	2,62	260	0,66
4	3	2,25	200	0,77
5	3	1,88	170	0,76
6	5	1,5	130	0,75
7	3	0,75	80	0,49

Se midió la profundidad de la zona dañada con pérdida de queratocitos y unos pocos queratocitos apoptóticos, utilizando una morfometría de redícula especial para el microscopio electrónico de transmisión, se prefijaron pequeñas piezas de córnea central en 4% de tetróxido de osmio, se deshidrataron y se colocaron en resina Epon. Después de la observación de las secciones semi delgadas teñidas con toluidine azul, se prepararon secciones ultra delgadas de 50-70 nm montadas en rejillas de cobre, contrastadas con acetato de uranil y citrato de plomo y se evaluaron utilizando un microscopio electrónico Morgagni 268 D (Phillips) a una magnificación de 3.500 – 34.000X.

### Evaluación con la Técnica TUNEL

Con el fin de detectar apoptosis con fragmentos de hilos de DNA in situ, se realizó la técnica *deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)-mediated x-dUTP nick end labeling* (TUNEL), tal como se describió anteriormente.<sup>8</sup> Brevemente después de enfriar el peroxidase endógeno, se incubaron las secciones con TdT (30mM Tris, 140 mmol/L de cacodilato sódico, 1mmol/L de cloruro de cobalto) con un pH de 7,2 y se encubaron con 0,3 u/mL TdT (Sigma, Munich, Alemania) y dUTP biotinilado (1:200; Boehringer, Mannheim, Alemania) en una solución de TdT durante 60 minutos, a 37°C. Se encontraron núcleos teñidos con Vectastain ABC (Vector Labs, Burlingame, CA) y se observó actividad de la peroxidase mediante 3-amino-9-etil carbazol (AEC), para producir un producto de reacción de color marrón rojizo. Se contrañeron las secciones ligeramente con hematoxilín. Como control positivo, se utilizaron secciones de tejido de hiperplasia folicular, los cuales produjeron los tintes positivos esperados de los cuerpos tangibles en los centros germinales.

### Cálculo del UVA Citotóxica

#### Irradiaciones y Dosis

Se determinó la irradiación UVA Citotóxica correlacionando la profundidad de la pérdida de queratocitos con las irradiaciones UVA correspondientes, alcanzadas en una profundidad estromal específica, que se calcularon de acuerdo con la ecuación  $I_{profundidad} = I_{superficie} e^{(-d\mu)}$  (ley Lambert-Beer), utilizando el coeficiente de absorción  $\mu$  de 53 cm<sup>-1</sup>, que encontramos en la mediciones de transmisión de UVA previas después del tratamiento de riboflavina (Tabla 1).<sup>4,9</sup>

Las dosis de irradiación (J/cm<sup>2</sup>), se calcularon de las irradiaciones UVA (mW/cm<sup>2</sup>), multiplicando el valor con el tiempo de irradiación en segundos (30 x 60).

## RESULTADOS

### Evaluación con Microscopía Luminosa y Técnica TUNEL

En las 6 córneas con cross-linking, todos los ojos de los animales matados a las 4 horas postoperatorias y los 4 ojos de control con abrasión corneal únicamente, matados a las 4 ó 24 horas postoperatorias, solo hubo la presencia de queratocitos apoptóticos dispersos a una profundidad de hasta 50 μm en el estroma anterior, tal como se demostró con la microscopía luminosa en las secciones teñidas mediante la técnica TUNEL y en la microscopía electrónica de transmisión.

En las 28 córneas con cross-linking y todos los ojos matados a las 24 horas postoperatorias, se observó, a diversas profundidades del estroma corneal, una pérdida masiva de queratocitos con casi una zona acelular y algunas células restantes apoptóticas positivas con la técnica TUNEL, o completamente destruidas o necróticas, que se correlaciona con la superficie de irradiación UVA (**Figuras 1, 2A-C, 3A; Tabla 1**). Todos estos cambios, únicamente estuvieron presentes en el área tratada con una zona de transición bien definida hacia el tejido adyacente de apariencia normal sin tratamiento (**Figura 2C**). Hubo presencia de rastros de epitelio delgado en regeneración sobre los bordes de la lesión, así como también ya había comenzado una migración epitelial en la zona de tratamiento desepitalizada, a las 24 horas (**Figura 2C**).

### Microscopía Electrónica de Transmisión

Los queratocitos apoptóticos irradiados revelaron cambios apoptóticos, como la formación de cuerpos apoptóticos, cromatina condensada y encogimiento de células (**Figuras 3B, C**).

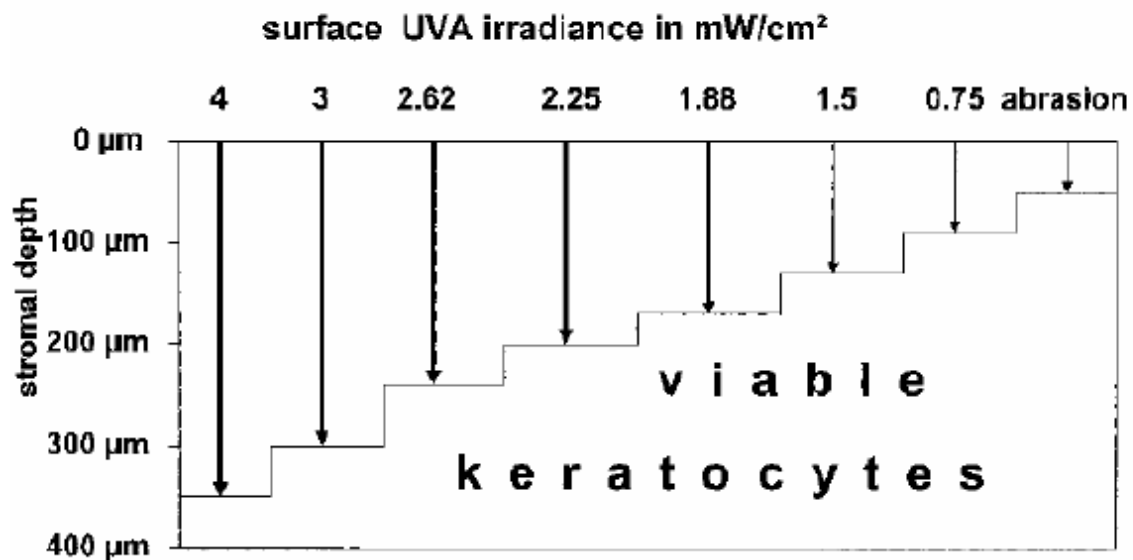


FIGURA 1. El esquema muestra la profundidad de la pérdida de queratocitos dependiendo de la superficie de irradiación UVA.

### Citotoxicidad

Se calculó el nivel de citotoxicidad para los queratocitos para las diversas profundidades estromales, de acuerdo a la ley de Lambert-Beer (ver arriba) y se encontró que estaba dentro de un rango de irradiación de 0,49 – 0,77 mW/cm<sup>2</sup>, que corresponde a las dosis de UVA de 0,86 – 1,39 J/cm<sup>2</sup>.

### DISCUSIÓN

El presente estudio ha demostrado un daño de queratocitos significativo después del tratamiento de cross-linking combinado de riboflavina/UVA, que se correlaciona estrechamente con el nivel de irradiación de UVA (**Figuras 1 y 2; Tabla 1**). Utilizando la ley Lambert-Beer y el coeficiente de absorción de 53 cm<sup>-1</sup> para la irradiación UVA en la córnea con riboflavina<sup>4,9</sup> fuimos capaces de deducir un umbral de irradiación citotóxica para los queratocitos en un rango de 0,5 – 0,7 mW/cm<sup>2</sup> de la profundidad de la pérdida de queratocitos y los niveles de irradiación correspondientes.



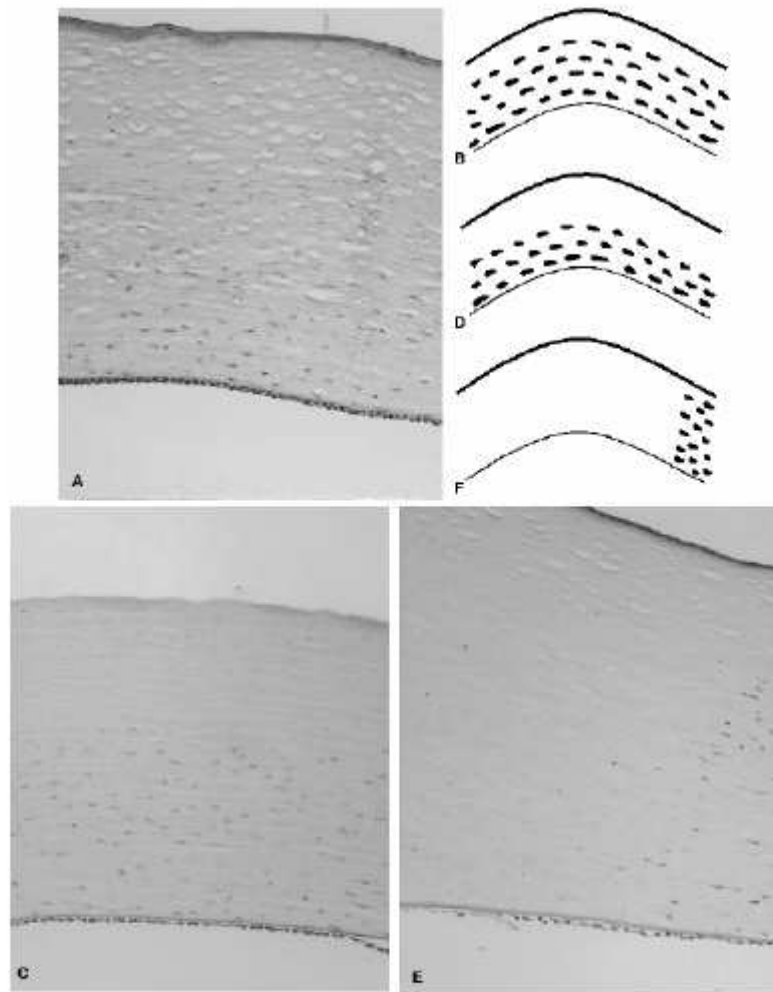
En los ojos de los animales irradiados que fueron matados a las 4 horas postoperatorias y en los ojos de control desepitalizados únicamente, se localizó una apoptosis de queratocitos en las 50  $\mu\text{m}$  anteriores, mientras que en los animales irradiados y matados a las 24 horas postoperatorias, se encontró una amplia y profunda pérdida de queratocitos. Obviamente, en los casos de los animales matados a las 4 horas postoperatorias, la apoptosis de queratocitos fue de tipo inmediato<sup>10-11</sup> y solo debido al raspado epitelial, tal como ha sido descrito por otros doctores después de una desepitalización corneal.<sup>12-13</sup> Correspondientemente, en los ojos enucleados a las 24 horas postoperatorias, se encontró un tipo de apoptosis más retardada, causada por los rayos UVA.<sup>10-11</sup> La riboflavina por sí misma no es citotóxica, pero como fotosensibilizador, incrementa la absorción de los UVA, lo que induce el daño celular.

Se ha informado un daño similar de queratocitos inducido por los UVA después de la irradiación UVA sin ningún agente fotosensibilizador. Utilizando conejos pigmentados, Pitts et al<sup>15</sup> encontraron un umbral de daño corneal en la superficie de la dosis de UVA (365nm) de 42,5 J/cm<sup>2</sup>. Nuestra superficie de dosis de UVA citotóxica relativamente baja en el rango de 1,35 – 7,2 J/cm<sup>2</sup>, puede explicarse mediante el efecto multiplicador sobre la absorción de UVA por la riboflavina.<sup>14</sup> La pérdida de queratocitos inducida por UVB, puede incluso encontrarse en niveles de dosis más bajos, debido a la longitud de onda más corta de los UVB con un mayor contenido de energía correspondiente.

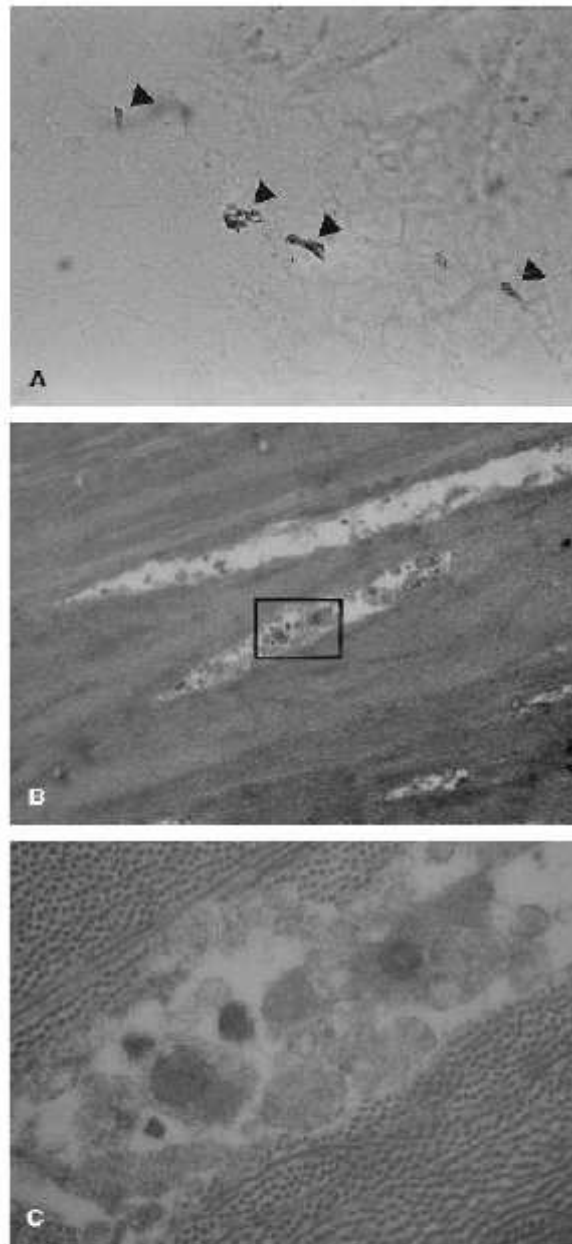
Histológicamente se observó daño de queratocitos, especialmente en el primer cuarto anterior de la córnea del conejo albino, después de una exposición a 290-350 nm de irradiación UVB durante 15 minutos.<sup>16</sup> Después de una irradiación de UVB de 0,12 J/cm<sup>2</sup> y 0,47 J/cm<sup>2</sup> a 310 nm, otros autores han informado una apoptosis de queratocitos extendida inducida por UV a través de todo el grosor de la córnea, 24 h después del tratamiento.<sup>17,18</sup>

Todavía no está clara la importancia clínica de una pérdida masiva de queratocitos, porque la pérdida de queratocitos usualmente puede repararse mediante la repoblación de queratocitos inmigrantes de la córnea adyacente.<sup>12,19</sup> Recientemente, en otras modalidades de tratamiento, como la abrasión corneal,<sup>20-22</sup> PRK,<sup>12,19</sup> LASIK<sup>12,19,23</sup> y la epiqueratoplastia<sup>24</sup>, o enfermedades como el queratocono<sup>25</sup> y el herpes,<sup>26</sup> se ha informado pérdida de queratocitos de diversas extensiones, teniendo una posible influencia en la cicatrización, haze<sup>27</sup>, o adelgazamiento corneal.<sup>20,25</sup> Sin embargo, en nuestro estudio clínico, después del tratamiento de cross-linking<sup>1</sup>, no hemos observado ningún cambio en la transparencia o en el grosor corneal. La aplicación del inhibidor de apoptosis de cloruro de zinc no es útil<sup>28</sup>, ya que el efecto de cross-linking deseado también se vería debilitado.<sup>14</sup>

En conclusión, hemos demostrado que el tratamiento de cross-linking combinado de riboflavina/UVA, provoca una apoptosis de queratocitos dependiente de la dosis a 0,86-1,39 J/cm<sup>2</sup> y puede esperarse en córneas humanas con grosor de 500  $\mu\text{m}$ , a una profundidad de hasta 300  $\mu\text{m}$ , utilizando la superficie de irradiación usual de 3mW/cm<sup>2</sup> (dosis de superficie de 5,4J/cm<sup>2</sup>). Actualmente se está llevando a cabo un estudio clínico a largo plazo, utilizando microscopía confocal in vivo<sup>29</sup> después de un tratamiento de riboflavina / UVA, para evaluar la profundidad de la pérdida de queratocitos y el proceso de repoblación y para excluir el desarrollo de cicatrización estromal, haze y adelgazamiento en humanos, relacionados con el tratamiento.



**FIGURA 2.** micrográfico luminoso (A) y diagrama esquemático (B) de pérdida de queratocitos y apoptosis hasta a 100  $\mu\text{m}$ , 24 horas después de la irradiación con una superficie de irradiación UVA de 0,75  $\text{mW}/\text{cm}^2$  (hematoxilín y eosin, x200). Micrográfico luminoso (C) y diagrama esquemático (D) de pérdida de queratocitos y apoptosis hasta a 170  $\mu\text{m}$ , 24 horas después de la irradiación con una superficie de irradiación UVA de 1,88  $\text{mW}/\text{cm}^2$  (hematoxilín y eosin, x200). Micrográfico luminoso (E) y diagrama esquemático(F) de transición del área irradiada con un total de pérdida de queratocitos a través del todo el estroma, 24 horas después de la irradiación con una superficie de irradiación UVA de 4  $\text{mW}/\text{cm}^2$  (hematoxylin y eosin, x200) a la córnea adyacente normal. Epitelio en recuperación adelgazado emigrando desde el costado derecho.



**FIGURA 3. A:** Queratocitos apoptóticos positivos con la técnica TUNEL (flechas) en la mitad posterior de la córnea, 24 horas después de la irradiación con una superficie de irradiación UV de  $4 \text{ mW/cm}^2$  (inmersión en aceite,  $\times 1000$ ). **B:** Cuerpos de células apoptóticas, cromatina de condensación y encogimiento de células en los queratocitos centrales, 24 horas después de la irradiación UVA con superficie de  $4 \text{ mW/cm}^2$  (TEM [microscopio electrónico de transmisión] acetato de uranil citrato de plomo,  $\times 3500$ ). El marco delinea la porción que se muestra magnificada en la Figura C. **C:** La alta magnificación de los queratocitos apoptóticos, ilustran los cuerpos de las células apoptóticas (TEM, acetato de uranil y citrato de plomo,  $\times 34,000$ ).



## REFERENCIAS

1. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet- A-induced collagen cross-linking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;135:620–627.
2. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine cornea after riboflavin/UV-A induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg*. 2003;29:1780–1785.
3. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. 1998;66:97–103.
4. Spoerl E, Schreiber J, Hellmund K, et al. Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen. *Ophthalmologe*. 2000;97:203–206.
5. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res* 2003 (submitted).
6. Schnitzler E, Spoerl E, Seiler T. Bestrahlung der Hornhaut mit UV-Licht und Riboflavingabe als neuer Behandlungsversuch bei einschmelzenden Hornhautprozessen, erste Ergebnisse bei vier Patienten. *Klin Mbl Augenheilkd*. 2000;217:190–193.
7. Seiler T, Koufala K, Richter G. Iatrogenic ectasia after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg*. 1998; 14:312–317.
8. Ihling C, Szombathy T, Nampoothiri K, et al. Cystic medial degeneration of the aorta is associated with p53 accumulation, Bax upregulation, apoptotic cell death, and cell proliferation. *Heart*. 1999;82:286–293.
9. Kolozsvári L, Nógrádi A, Hopp B, et al. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:2165–2168.
10. Michael R, Vrensen GFJM, van Marle J, et al. Apoptosis in the rat lens after in vivo threshold dose ultraviolet irradiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:2681–2687.
11. Pourzand C, Tyrrell RM. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol*. 1999;70:380–390.
12. Helena MC, Baerveldt F, Kim W-J, et al. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:276–283.
13. Kim W-J, Helena MC, Mohan RR, et al. Changes in corneal morphology associated with chronic epithelial injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:35–42.
14. Cho K-S, Lee EH, Choi J-S, et al. Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:911–919.
15. Pitts DG, Cullen AP, Hacker PD. Ocular effects of ultraviolet radiation from 295-365 nm. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977;16:932–939.
16. Ringvold A, Davanger M. Changes in the rabbit corneal stroma caused by UV radiation. *Acta Ophthalmol*. 1985;63:601–606.
17. Podskochy A, Gan L, Fagerholm P. Apoptosis in UV-exposed rabbit corneas. *Cornea*. 2000;19:99–103.
18. Podskochy A, Fagerholm P. Cellular response and reactive hyaluronan production in UV-exposed rabbit corneas. *Cornea*. 1998;17:640–645.
19. Wilson SE. Keratocyte apoptosis in refractive surgery. *CLAO J*. 1998;24:181–185.
20. Wilson SE, Kim W-J. Keratocyte apoptosis: Implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39: 220–226.
20. Wilson SE, He Y-G, Wenig J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res*. 1996;62:325–337.
21. Campos M, Szerenyi K, Lee M, et al. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol*. 1994;112:254–260.
22. Mitooka K, Ramirez M, Maguire LJ, et al. Keratocyte density of central human cornea after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol*. 2002;133:307–314.
23. Binder PS, Baumgartner SD, Fogle JA. Histopathology of a case of epikeratophakia (aphakic epikeratoplasty). *Arch Ophthalmol*. 1985;103:1357–1363.
24. Kim W-J, Rabinowitz YS, Meisler DM, et al. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;69:475–481.
25. Wilson SE, Pedroza L, Beuerman R, et al. Herpes simplex virus type-1 infection of corneal epithelial cells induces apoptosis of the underlying keratocytes. *Exp Eye Res*. 1997;64:775–779.
26. Nagy ZZ, Hiscott P, Seitz B, et al. Ultraviolet-B enhances corneal stromal response to 193-nm excimer laser treatment. *Ophthalmology*. 1997;104:375–380.
27. Kuo IC, Seitz B, LaBree L, et al. Can zinc prevent apoptosis of anterior keratocytes after superficial keratectomy? *Cornea*. 1997;16:550–555.
28. Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, et al. The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*. 2000;19:185–193.

**Fuente: Cornea. Enero 2004; 23:43–49**

**NOTA:** "La traducción al castellano no ha sido preparada por ningún traductor con titulación oficial al respecto. Ha sido preparada a título meramente informativo por OftalTech sin ningún tipo de garantía ni responsabilidad sobre su exactitud ni aun en el caso de error. Tampoco se hace responsable OftalTech sobre las informaciones contenidas en el documento original. El destinatario deberá efectuar sus propias comprobaciones al respecto y no efectuará ninguna actuación sobre la base de la información suministrada por OftalTech. "