

CITOTOXICIDAD DE LOS QUERATOCITOS DEL TRATAMIENTO CON RIBOFLAVINA-UVA IN VITRO

G Wollensak, E Spoerl, F Reber y T Seiler

Abstract

Propósito: El cross-linking de colágeno utilizando irradiación de rayos ultravioletas A (UVA) en combinación con riboflavina fotosensibilizadora, es una nueva técnica para tratar el queratocono progresivo. Se ha demostrado que incrementa la eficacia de la rigidez biomecánica de la córnea y que detiene, o incluso revierte, la progresión del queratocono. Como parte de una evaluación de seguridad, se llevó a cabo el presente estudio para investigar in vitro el posible efecto citotóxico del tratamiento combinado de riboflavina/UVA en los queratocitos corneales y compararlo con la irradiación UVA.

Métodos: Se trataron culturas de células de queratocitos de cerdo establecidas, con una solución de riboflavina al 0,025% y diferentes irradiaciones UVA (370 nm), con rango de 0,4 a 1,0 mW/cm² y también se trataron únicamente con UVA entre 2 y 9mW/cm², durante 30 minutos. 24 horas después de la irradiación, se evaluaron las culturas de las células muertas utilizando trypan blue y tinta Yopro-fluorescente.

Resultados: Después de la irradiación de UVA combinada con riboflavina fotosensibilizadora, se encontró un umbral de irradiación citotóxica de 0,5 mW/cm² para los queratocitos, que es 10 veces más bajo que la irradiación citotóxica de 5mW/cm², después de la irradiación únicamente con UVA.

Conclusiones: Se espera que el efecto citotóxico del tratamiento de riboflavina / UVA en los queratocitos, sea de 0,5 mW/cm², que es lo que se obtiene en una configuración clínica en córneas humanas hasta una profundidad de 300 µm, utilizando una superficie estándar de irradiación de UVA de 3mW/cm².

Palabras clave: queratocitos; UVA; riboflavina; necrosis; cultura de células; cross-linking.

Introducción

Recientemente, hemos desarrollado un nuevo método para el tratamiento del queratocono mediante la inducción del cross-linking de colágeno en la córnea, utilizando rayos ultravioleta (UVA) y riboflavina fotosensibilizadora. El cross-linking de colágeno provoca un incremento en los vínculos covalentes intra e inter fibrilares mediante la oxidación fotosensibilizada y causa una estabilización biomecánica de la córnea. En un estudio clínico prospectivo piloto, incluyendo 22 pacientes con queratocono moderado o avanzado y con un periodo de seguimiento de hasta 4 años, pudo detenerse la progresión del queratocono en todos los ojos tratados. En el 70% de los pacientes se alcanzó una regresión con una reducción de las lecturas queratométricas máximas de 2 D.¹

En las mediciones de tensión-presión de córneas humanas,² de cerdo,^{2,3} y de conejo⁴, se encontró un incremento significativo en la rigidez mecánica. Se pudo demostrar un incremento en la resistencia al colagenosis.⁵ Además del queratocono y de las úlceras corneales, el nuevo tratamiento puede utilizarse en los procesos de "melting" corneal⁶ y en el campo de la Cirugía Refractiva, para reducir el riesgo de queratectasia iatrogénica después del LASIK (laser assisted in situ keratomileusis).⁷

El impacto de las diversas modalidades de tratamiento como la abrasión corneal, la PRK (queratocotomía fotorrefractiva),⁸ el LASIK,^{8,9} y la lesión epitelial¹⁰⁻¹² en los queratocitos, ha ganado un considerable interés durante los últimos años, teniendo una posible influencia en la cicatrización o el adelgazamiento corneal.¹⁰ Por lo tanto, como parte de una evaluación

de seguridad completa, hemos llevado a cabo el siguiente estudio experimental para estudiar y evaluar el posible daño a los queratocitos corneales después de un tratamiento combinado de riboflavina/UVA y lo hemos comparado con la irradiación de UVA.

Materiales y Métodos

Materiales

Todos los cultivos primarios y las series de pasaje, se llevaron a cabo en un medio de crecimiento, consistente del medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal de bovino al 10% (FCS, de Sigma, Deisenhofen, FRG), rojo de fenol y antibióticos (penicilina-estreptomomicina). Para la viabilidad del estudio,¹⁴ se utilizaron tintas de solución Trypan Blue¹³ (Biochrome AG, Berlín, FRG) y Yopro (Molecular probes, Eugene, OR, USA)-fluorescente.

Condiciones del cultivo del explante

Se utilizaron las culturas del explante¹³ de ojos de cerdo, que se obtuvieron de un matadero local a las 3-5 horas post mortem. Se extrajo el epitelio mecánicamente utilizando un cuchillote hockey despuntado. Se cortaron piezas de 6X6 mm de la lamela estromal media con tijeras y se transfirieron dentro de un matraz de cultivo de células de 25 cm² (Nunc, Wiesbaden, FRG).

Se llenó el matraz con 2ml de DMEM, más 10% de suero fetal de bovino y se colocó dentro de una incubadora con gas de dióxido de carbono al 6%, a una temperatura de 37°C. El crecimiento de las células de los explantes estromales comenzó a partir de los 10-12 días y a los 21 días se alcanzó una confluencia con aproximadamente 2.5 X 10⁶ células por matraz.

Los medios se cambiaron cada semana. El pasaje del stock de cultivos confluentes se realizó cada 3 semanas, con una razón de fracción de 1:3. Para la disociación y desprendimiento, se trataron las culturas con solución Trypsin_EDTA al 0,05%. Se centrifugaron las células libres a 230 g, se transfirieron dentro de nuevos matraces de cultivo y se volvieron a suspender. Se evaluó el crecimiento celular de manera regular, utilizando un microscopio invertido de fasecontraste con una magnificación de X100 (Zeiss Axiovert L5). Antes de la irradiación, se colocaron 5 X 10⁴ células en 8 placas de tejido con recipientes, en donde alcanzaron la confluencia después de 8-10 días. Después de una semana, se realizó la irradiación con UVA.

Grupos de Tratamiento

Las células se expusieron a 3 diferentes tratamientos:

1. Solo riboflavina: Las células se expusieron a una solución de riboflavina a 25, 50, 100 y 500 µM.
2. Riboflavina más UVA: Las células se expusieron a una solución de riboflavina al 0,025% (=500 µm) más irradiaciones UVA con un rango de 0.4 a 1mW/cm² (**Tabla 1**).
3. Solo UVA: Las células se expusieron a irradiaciones UVA con un rango a partir de 2 a 9mW/cm² (**Tabla 1**).

Excepto por las variaciones en las irradiaciones UVA, en el tratamiento clínico del segundo grupo de tratamiento se mantuvieron idénticos otros parámetros, como la concentración de riboflavina, o la longitud de onda de los rayos UVA de 370 nm.

Procedimiento de irradiación

Se seleccionó una concentración de riboflavina lo más semejantemente posible a la de las condiciones del tratamiento clínico de las córneas humanas y se calculó de la siguiente manera. En los humanos se instila una solución de riboflavina al 0,1%. Utilizando la llamada ecuación de difusión y el coeficiente de difusión ($D=6.5 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$) del tinte de fluoresceína relacionado, calculamos que la concentración de riboflavina media durante 30 minutos en el estroma, es una solución de riboflavina al 0,024%. Por lo tanto, utilizamos una solución de riboflavina de 0,025% (=500 μm), agregando 57 μm de solución de riboflavina al 0,2% a 400 μl de cultivo medio incoloro sin rojo de fenol. No se agregó riboflavina a los cultivos en donde se aplicó únicamente rayos UVA. La solución de riboflavina para la irradiación de UVA se agregó a los recipientes 5 minutos antes de la irradiación y se reemplazó por el medio de cultivo después de la irradiación. Para evitar la absorción de los UVA por la solución de riboflavina que cubría la mono capa de queratocitos pegados en la superficie inferior de los recipientes, los irradiamos desde abajo, fijando el diodo doble de UVA (370nm) a 1 cm bajo cada uno de los recipientes correspondientes (**Figura 1**) con la ayuda de un soporte. La medición de la absorción de los rayos UVA por la superficie inferior delgada de los recipientes de 100 μm hecha de borosilicona, fue tan solo de 2% e insignificante. Antes del tratamiento, se controlaron las irradiaciones de UVA necesarias de 0.4 a 9mW/cm², con un medidor de UVA (LaserMate-Q, LASER 2000, Wessling, Alemania) a una distancia de 1 cm y en caso de que hubiese sido necesario, se hubiese regulado en series con un potenciómetro. La irradiación misma duró 30 minutos, de acuerdo con la configuración clínica. Se probaron 5 recipientes para cada nivel de irradiación. Se calcularon las dosis de irradiación (J/cm²) de las irradiaciones UVA (mW/cm²), multiplicando el valor con el tiempo de irradiación en segundos (=30X60).

Tabla 1. Citotoxicidad para los queratocitos de cerdo después de un tratamiento combinado de riboflavina / UVA y después de aplicar únicamente irradiación de UVA

| <i>Nivel de Irradiación (mW/cm²)</i> | <i>Riboflavina + UVA</i> | <i>UVA</i> |
|---|--------------------------|------------|
| 9 | | + |
| 8 | | + |
| 7 | | + |
| 6 | | + |
| 5 | | + |
| 4,5 | | - |
| 4 | | - |
| 3 | | - |
| 2 | | - |
| 0,8 | + | |
| 0,7 | + | |
| 0,6 | + | |
| 0,55 | + | |
| 0,5 | + | |
| 0,45 | - | |
| 0,4 | - | |

(+) Necrosis , (-) sin daño a las células



Figura 1 Procedimiento de irradiación con un diodo de UVA doble, bajo los recipientes de la placa de cultivo.



Figura 3 Sector periférico del área de tratamiento circular (riboflavina más 0.5mW/cm² UVA) con queratocitos positivos teñidos con trypan blue y pérdida de células (trypan blue, X 400).



Figura 2 Morfología representativa de los queratocitos de cerdo cultivados en confluencia (fase de contraste X 100)



Figura 4 Sector periférico del área de tratamiento circular (5mW/cm² UVA) con núcleos de queratocitos teñidos con Yopro (Yopro, X 400).

Tinción Supravital

Para determinar un posible daño celular después del tratamiento, se aplicó en cada recipiente 100 μ l de solución trypan-blue al 0,25%, disuelta en medio de cultura incoloro, durante 15 minutos y seguido de dos aclarados con medio de cultura. Después de la evaluación microscópica del teñido con trypan-blue,¹³ se tiñeron las células con Yopro, agregando 1 μ l por recipiente, seguido de un aclarado con medio de cultura.¹⁴ Para el trypan-blue (**Figuras 2 y 3**), se examinaron las culturas en un microscopio inverso (Leica DMIR) a una magnificación de 100-400 y utilizando fluoresceína a 488 nm (N2.1 filter). Se tomaron fotografías con una cámara digital adjunta al microscopio (Nikon cooplux 950). Solo los núcleos de las células dañadas quedaron marcadas con el colorante.

Resultados

Características Celulares

Antes de la confluencia, las células dispersas parecían dendríticas, mientras que asumían una apariencia con forma husa al alcanzarse la confluencia (**Figura 2**). Aproximadamente el 10% de las células contenían gránulos fluorescentes con cierto color marrón, típico de los depósitos lipofuscinos. Después de la dosis citotóxica, los núcleos de las células dañadas quedaron manchados positivamente con trypan blue (**Figura 3**) y Yopro verde fluorescente (**Figura 4**). El daño de las células detectado mediante los dos tintes en las mismas células al mismo nivel de irradiación, siempre fue observable. Adicionalmente, las células muertas tomaron una forma más globular y aproximadamente del 5 al 10% de las células muertas

dañadas perdieron adhesión, flotando en el fondo de los recipientes. El área de las células dañadas tenía forma de círculo, casi como una huella del haz de los UVA, con las células supervivientes únicamente en la periferia no irradiada (**Figuras 3 y 4**).

Citotoxicidad

Para los queratocitos después de la riboflavina combinada con irradiación de rayos UVA, se encontró que la irradiación citotóxica era 10 veces menor, 0.5mW/cm². (=0.9 J/cm²), en comparación a los 5mW/cm² (=9 J/cm²) para las células únicamente con irradiación UVA (**Tabla 1**). El efecto citotóxico ocurrió con un efecto umbral: una transición rápida y abrupta de niveles de irradiación dañinos a no tóxicos. No hubo variación en los cinco recipientes diferentes por nivel de irradiación y en todo momento, todas las células irradiadas con la dosis tóxica, fueron dañadas. No hubo citotoxicidad para las células tratadas únicamente con riboflavina, sin rayos UVA.

Discusión

El presente estudio ha demostrado un umbral citotóxico de irradiación del tratamiento combinado de riboflavina/UVA, de 0.5mW/cm². Utilizando la superficie de irradiación estándar de 3mW/cm² y el coeficiente de absorción de 53 cm⁻¹, puede calcularse, de acuerdo con la ecuación Lambert-Beer $I_{\text{profundidad}} = I_{\text{superficie}} e^{(-\mu x)}$ que en las córneas humanas la irradiación UVA de queratocitos citotóxica de 0.5mW/cm² se alcanza en una profundidad estromal de 300 μm.^{4,15} Estos datos se ajustan a nuestros resultados in vivo con córneas de conejo tratadas con riboflavina/UVA, en donde encontramos exactamente la misma irradiación citotóxica de 0.5mW/cm², con una pérdida de queratocitos a una profundidad de 300 μm después de la irradiación de la superficie de 3mW/cm².¹⁶

Otros autores también han informado de daño de queratocitos y depende de la longitud de onda ultravioleta y de la dosis. Mientras que los rayos ultravioleta C (UVC) (100-290 nm) son completamente absorbidos en la superficie corneal, el 80% de los rayos ultravioleta B (UVB) (290-315 nm) en el epitelio corneal y del 25% al 34% de los rayos UVA (315-400 nm) se absorben en el estroma.¹⁷ Por consiguiente, se observó un daño de queratocitos masivo, especialmente en la porción anterior de la córnea de conejo, después de la exposición a la irradiación UVA a 350 nm.^{18,19}

En el presente estudio in vitro, el nivel de irradiación citotóxico después del tratamiento combinado de riboflavina/UVA, fue 10 veces menor que después del tratamiento con solo rayos UVA, porque el efecto citotóxico, que se debe al efecto oxidante de la luz UVA, se multiplica por la riboflavina fotosensibilizadora debido a un incremento en la absorción de rayos UVA.

Concurrente con esta observación, demostramos que la absorción de los UVA se incrementó a 95%⁴ en la córnea después del tratamiento con riboflavina, en comparación con el 25–35% sin riboflavina.¹⁷

La riboflavina (vitamina B2) sola, no produjo daños a las células, tal como se ha demostrado en otros experimentos²⁰ y esto no es sorprendente, puesto que la riboflavina también está presente en la retina, el hígado y el corazón, siendo un elemento esencial en la nutrición normal.²¹

En términos de problemas clínicos de pérdida de queratocitos, solo los desequilibrios a largo plazo de la reconstitución de queratocitos constituyen el riesgo de adelgazamiento corneal.^{8,10}



Sin embargo, esta situación no es de esperar, puesto que la pérdida de queratocitos puede repararse rápidamente mediante la repoblación de los queratocitos emigrantes de la córnea adyacente.^{8,22} La pérdida de queratocitos ya ha sido observada en otros procedimientos corneales, sin consecuencias dramáticas. Así que después de una PRK,⁸ un LASIK,^{8,9} o un daño epitelial,¹⁰⁻¹² se describió un grado variable de apoptosis de los queratocitos. No obstante, el tratamiento relacionado con la apoptosis de los queratocitos podría ser un problema, debido al presunto papel de la apoptosis de los queratocitos en la patogénesis del queratocono.⁸

El estado de los queratocitos de la irradiación UVA se evaluó 24 horas después, porque es cuando existe el máximo grado de daño celular, tal como se ha demostrado anteriormente.¹⁶

Para determinar una posible muerte de células, primero realizamos el teñido con trypan blue seguido de Yopro.¹⁴ Ambas tintas son positivas si los núcleos de las células se dañan sin interferir con la viabilidad de la célula, mientras que las células endoteliales sin daño alguno son impermeables a estos tintes. El tinte intercalante Yopro DNA, también es capaz de detectar daños menores, como en las células apoptóticas, debido a su peso molecular relativamente bajo (MW 629 vs 961).¹⁴ Pero debido a que el umbral para el Yopro y el trypan blue fue congruente en el mismo nivel de dosis, el daño celular en el presente experimento *in vitro* se debe principalmente a la necrosis, ya que de otro modo, la mancha de Yopro también debería de ser positiva en niveles de irradiación más bajos que el nivel encontrado por el trypan blue.

En conclusión, hemos demostrado que el tratamiento combinado de riboflavina/UVA, provoca un umbral 10 veces más bajo para la citotoxicidad de queratocitos de 0.5mW/cm², comparado con los 5mW/cm² después de únicamente irradiación UVA. Al utilizar riboflavina/UVA en córneas humanas, se puede esperar que el daño de queratocitos suceda a una profundidad de 300 µm, utilizando una superficie de irradiación de 3mW/cm². Aunque no se ha observado adelgazamiento o cicatrización corneal por la pérdida de queratocitos en el estudio clínico de 4 años,¹ actualmente se está llevando a cabo un estudio a largo plazo, incluyendo microscopía confocal *in vivo* en humanos después del tratamiento con riboflavina/UVA, con el fin de evaluar la profundidad de la pérdida de queratocitos, el proceso de repoblación y de excluir de manera fiable el desarrollo en humanos de cicatrización estromal, haze o adelgazamiento.



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 corneas after riboflavin-ultraviolet- 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, Seiler T, Knuschke P. 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 EyeRes* 2003, accepted for publication.
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. Iatrogenic keratectasia: academic anxiety or serious risk? (Editorial). *J Cataract Refract Surg* 1999; 25: 1307–1308.
8. Wilson SE. Keratocyte apoptosis in refractive surgery. *CLAO J* 1998; 24: 181–185.
9. Mitooka K, Ramirez M, Maguire LJ, Erie JC, Patel SV, McLaren JW et al . Keratocyte density of central human cornea after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 307–314.
10. Kim W-J, Helena MC, Mohan RR, Wilson SE. Changes in corneal morphology associated with chronic epithelial injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 35–42.
11. Campos M, Szerenyi K, Lee M, McDonnell JM, Lopez PF, McDonnell PJ. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 254–260.
12. Gurelik BG, Bilkigihan K, Sezer C, Akyol G, Hasanreisoglu B. Effect of mechanical vs dilute ethanol epithelial removal on keratocyte apoptosis and polymorpho-nuclear leukocyte migration. *Eye* 2002; 16: 136–139.
13. Borderie VN, Lopez M, Lombet A, Carvajal-Gonzalez S, Cywiner C, Laroche L. Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 40: 1511–1519.
14. Idziorek T, Estaquier J, De Bels F, Ameisen J-C. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J Immunol Meth* 1995; 185: 249–258.
15. Kolozsvári L, No´gra´di A, Hopp B, Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2165–2168.
16. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen-cross-linking using riboflavin-UVA treatment. *Cornea* 2003, accepted for publication.
17. Tsubai T, Matsuo M. Ultraviolet light-induced changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of porcine corneas. *Cornea* 2002; 21: 495–500.
18. Ringvold A, Davanger M. Changes in the rabbit corneal stroma caused by UV-radiation. *Acta Ophthalmol* 1985; 63: 601–606.
19. Pitts DG, Cullen AP, Hacker PD. Ocular effects of ultraviolet radiation from 295-365 nm. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16: 932–939.
20. Cho K-S, Lee EH, Choi J-S, Joo C-K. Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis on bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 911–919.
21. Dollery C *Therapeutic Drugs*, Vol. 2. Churchill Livingstone: Edinburgh, 1991, pp 24–25.
22. Podskochy A, Fagerholm P. Cellular response and reactive hyaluronan production in UV-exposed rabbit corneas. *Cornea* 1998; 17: 640–645.

Fuente: Eye (2004) 18, 718–722. doi:10.1038/sj.eye.6700751

Publicado online el 23 de enero de 2004

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 Ofaltech sin ningún tipo de garantía ni responsabilidad sobre su exactitud ni aun en el caso de error. Tampoco se hace responsable Ofaltech 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 Ofaltech. "