



DAÑO CELULAR ENDOTELIAL DESPUÉS DE UN TRATAMIENTO DE RIBOFLAVINA / ULTRAVIOLETA – A EN CONEJOS

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

Propósito: Evaluar el posible efecto citotóxico del tratamiento combinado de riboflavina / Ultravioleta-A (UVA), en el endotelio corneal.

Sitio: Departamento de Oftalmología, Universidad Técnica de Dresden, Alemania.

Métodos: Se trataron los ojos derechos de 34 conejos blancos de Nueva Zelanda, con riboflavina y diversas dosis de UVA, con un rango de 0,16 a 0,9 J/cm² (0,09 a 0,5 mW/cm², 370 nm) y tiempos de enucleación de 4 y 24 horas. Se evaluaron las células endoteliales en secciones histológicas. Se utilizaron las técnicas TUNEL (deoxynulceotidyl transferase deoxy-UTP-nick-end labeling) y de microscopía electrónica de transmisión, para detectar la apoptosis.

Resultados: No hubo daño endotelial en 6 conejos enucleados a las 4 horas. En aquellos enucleados a las 24 horas, hubo una necrosis significativa y apoptosis de las células endoteliales en las córneas tratadas con una dosis endotelial de 0,65 J/cm² (0,36 mW/cm²), que es aproximadamente el doble de la dosis de UVA endotelial utilizada en el tratamiento del queratocono en pacientes.

Conclusiones: En las córneas de conejo con un grosor menor a 400 μm, la dosis de UVA endotelial alcanzó un nivel citotóxico de 0,65 J/cm² (0,36 mW/cm²), utilizando la superficie de dosis de UVA estándar de 5,4 J/cm² (3 mW/cm²). Debería realizarse la paquimetría de manera rutinaria antes del tratamiento de riboflavina/ UVA; en las córneas más delgadas, no debe realizarse la irradiación debido al riesgo citotóxico al endotelio.

El cross-linking de colágeno utilizando un tratamiento combinado de riboflavina–ultravioletas-A (UVA), provoca un incremento significativo en la rigidez mecánica, tal como se demuestran en las mediciones de tensión-presión¹⁻³ y un incremento en la resistencia del colagenosis.⁴ El principal uso clínico del tratamiento es el queratocono progresivo,⁵ úlceras corneales,⁶ y antes del láser in situ keratomileusis en ojos con alta miopía, para reducir el riesgo de regresión miópica postoperatoria o de queratectasia iatrogénica.

La conservación del endotelio es crucial en cada tratamiento que involucra la córnea; el conteo mínimo de células endoteliales para una córnea transparente, es de 400 a 800 células endoteliales / mm².⁷ Sin embargo, el riesgo involucrado en el nuevo método de cross-linking es desconocido y es una preocupación principal que debe clarificarse antes de que la técnica se aplique a mayor escala. En este estudio experimental, evaluamos el daño citotóxico en el endotelio corneal después de un tratamiento con riboflavina-UVA.

Materiales y Métodos

Ojos de Conejo

En los experimentos, se utilizaron 36 ojos de 36 conejos blancos de Nueva Zelanda hembras, con un peso de 2,0 a 2,5 Kg.

Los animales se dividieron en 2 grupos: 7 conejos matados a las 4 horas postoperatorias y 29 conejos matados a las 24 horas postoperatorias. En el primer grupo, se irradiaron 2 conejos con una dosis UVA endotelial de 0,65 J/cm² (irradiación 0,36 mW/cm²); 1 con 0,9 J/cm² (0,5 mW/cm²); 2 con 0,33 J/cm² (0,18 mW/cm²), que era el equivalente a la intensidad de UVA endotelial utilizada en humanos; y 1 con 0,16 J/cm² (0,09 mW/cm²) (**Tabla 1**). Estos animales (n=6) fueron matados a las 4 horas postoperatorias. Otro conejo adicional recibió únicamente abrasión corneal y también fue matado a las 4 horas postoperatorias.

En el segundo grupo, se trataron 28 conejos con riboflavina y se irradiaron con una dosis UVA endotelial con un rango de 0,16 a 0,9 J/cm² (irradiación de 0,09 a 0,5 mW/cm²) (ejemplo, dosis con superficie epitelial de 1,35, 2,7, 3,4, 4,0, 4,7, 5,4 y 7,2 J/cm² (irradiación 0,75, 1,5, 1,88, 2,25, 2,62, 3,0, y 4,0 mW/cm²)) (**Tabla 1**) y fueron matados a las 24 horas postoperatorias. Un conejo adicional recibió únicamente abrasión corneal y también fue matado a las 24 horas.

Procedimiento del Tratamiento

Se indujo anestesia general con una inyección subcutánea de una mezcla de diazepam (1 ampolla Faustan®) y atropina (1,2 ampolla, 1 mg). Como premedicación, se utilizó 1,5 mL de hidrocloreto de ketamina (5 mg/Kg). Los conejos fueron colocados sobre su costado izquierdo con el ojo izquierdo cerrado; el ojo derecho se mantuvo abierto con blefarostato (**Figura 1**). Se extrajo la porción central de 5,0 mm del epitelio con un cuchillito despuntado; 5 minutos antes de la irradiación, se aplicó sobre la córnea una solución de riboflavina fotosensibilizadora, conteniendo 0,1% de riboflavina – 5- fosfato y 20% de dextrán T-500, para alcanzar una buena penetración corneal de la solución; esto se repitió cada 5 minutos durante la irradiación. Los ojos fueron expuestos a los rayos UVA (370 nm) con un rango de superficie de 0,75 a 4,0 mW/cm² (**Tabla 1**), durante 30 minutos, utilizando un diodo doble de UVA (Roithner Lasertechnik), colocado a 1,0 cm de la córnea (**Figura 1**). Las irradiaciones endoteliales UVA entre 0,09 y 0,50 mW/cm², se calcularon de acuerdo a la ecuación $I_{\text{profundidad}} = I_{\text{superficie}} \times e^{-(\mu \cdot d)}$, en donde la profundidad (d) fue de 400 μm y el coeficiente de absorción UVA (μ) fue de 53 cm^{-1} , determinado en mediciones de transmisión UVA previas, después de un tratamiento con riboflavina.² Antes del tratamiento, la irradiación deseada fue controlada con un calibrador de UVA ((LaserMate-Q, Laser 2000) a 1,0 cm y, en caso de ser necesario, se reguló con un potenciómetro.

En los animales matados a las 4 horas postoperatorias, se mantuvo la anestesia con inyecciones adicionales. Los otros animales fueron matados bajo anestesia general con una sobredosis de fenobarbital sódico a las 24 horas postoperatorias. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité de ética y se realizaron de acuerdo con la Declaración de la ARVO para el Uso de Animales en la Investigación Oftalmológica y de la Visión.

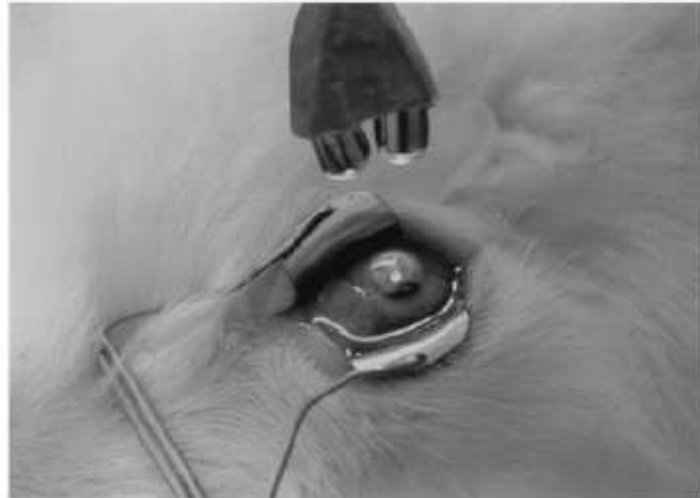


Figura 1. (Wollensak) Procedimiento de irradiación mostrando un diodo doble de UVA, a 1,0 cm de la córnea de conejo tratada con riboflavina.

Tabla 1. Grupos de tratamiento, superficie de irradiación UVA epitelial y endotelial y citotoxicidad endotelial en conejos (únicamente animales con 24 horas post-mortem)

Grupo	Nº de Animales	Superficie de Irradiación UVA Epitelial (mW/cm ²)	Irradiación UVA Endotelial (mW/cm ²)	Citotoxicidad Endotelial
1	3	4,0	0,50 ± 0,07	+++
2	6	3,0	0,36 ± 0,04	+++
3	5	2,62	0,32 ± 0,04	0
4	3	2,25	0,27 ± 0,03	0
5	3	1,88	0,23 ± 0,03	0
6	5	1,5	0,18 ± 0,02	0
7	3	0,75	0,09 ± 0,01	0

Preparación del Tejido

Después de la enucleación, se cortaron los ojos por la mitad y se fijaron en formalina neutralizada al 4% para la microscopía luminosa y en glutaraldeído al 2% para la microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para la microscopía luminosa, se tiñeron 4µm de secciones de parafina con hematoxilín y eosín. Se analizaron los especímenes utilizando un microscopio luminoso de Zeiss (Axiomat) a una magnificación de X20 a X1000.

Para la microscopía electrónica, se fijaron pequeñas piezas de córnea central en tetraóxido de osmio al 4%, se deshidrataron y se colocaron en resina Epon. Se tiñeron secciones semi delgadas con toluidine blue. Se contrastaron secciones ultra delgadas de 50 a 70 nm con acetato de uranio y citrato de plomo y se evaluaron utilizando un microscopio electrónico 268 D (Phillips) a una magnificación de X2800.



Evaluación con la Técnica TUNEL

Se realizó la técnica "Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxy-UTP-nick-end abeling" para detectar apoptosis, esencialmente tal como lo describió Ihling et al.⁸

Brevemente, después de que se extinguió la peroxidasa endógena, se encubaron las secciones con TdT (30 mN TRIS, 140 mM de cacodilato sódico, 1mM de cloruro de cobalto) a pH 7,2 y se encubaron con 0,3 eu/mL de TdT (Sigma) y dUTP biotinilado (1:200; Boehringer) con protector TdT durante 60 minutos, a 37°C. Se detectaron los núcleos marcados con Vectastain ABC (Vector Labs) y se observó la actividad de la peroxidasa mediante 3-amino-9-etilcarbazole, para obtener un producto de reacción marrón rojizo. Se volvieron a teñir ligeramente las secciones con hematoxilina. Como control positivo, se utilizaron secciones de tejido de hiperplasia folicular. También se incluyeron las secciones de control negativas.

Paquimetría

Preoperatoriamente, se determinó el grosor corneal de las córneas de conejo con un paquímetro de ultrasonido (Pachette, Technomed).

Resultados

Histología

En los 6 animales tratados y matados a las 4 horas y en los 2 casos con tan solo abrasión epitelial, no se observó resultado positivo de la técnica TUNEL de pérdida de células epiteliales del endotelio. En los animales matados a las 24 horas, se observó una necrosis significativa de las células con pérdida completa de células endoteliales (**Figura 2**) y pocas células endoteliales apoptóticas remanentes en el área de tratamiento de los ojos que tuvieron una dosis de UVA en el endotelio de 0,9 J/cm² (0,5 mW/cm²) y de 0,65 J/cm² (0,36 mW/cm²), que fue dos veces mayor que la dosis endotelial terapéutica en humanos de 0,32 J/cm² (0,18 mW/cm²) (**Tabla 1**).

En los animales expuestos a una dosis UVA endotelial de 0,16 a 0,58 J/cm² (0,09 a 0,32 mW/cm²), las células endoteliales permanecieron intactas.

Evaluación con la técnica TUNEL y TEM

Utilizando la técnica de teñido TUNEL, las pocas células endoteliales en los 2 grupos (0,9 J/cm² y 0,65 J/cm²) fueron positivas de TUNEL, mostrando una mancha nuclear de color marrón (**Figura 3**).

En TEM, las células endoteliales apoptóticas mostraron características típicas de una apoptosis de cromatina de condensación, formación de cuerpos apoptóticos y encogimiento celular (**Figura 4**).

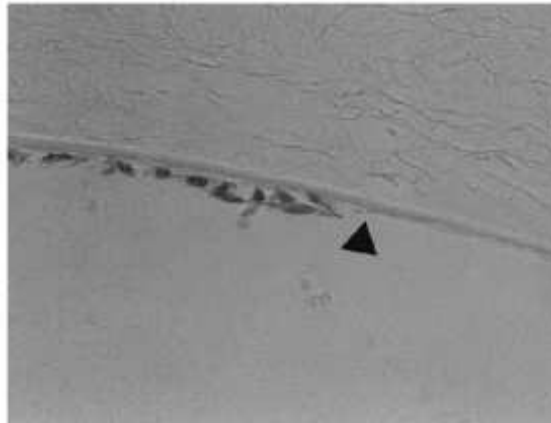


Figura 2. (Wollensak) Pérdida de células endoteliales completa en la zona de tratamiento con una clara demarcación hacia el área sin tratar (flecha) (dosis UVA endotelial de 0,9 J/cm²).

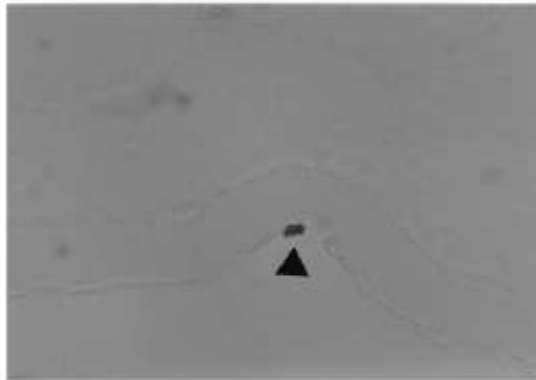


Figura 3. (Wollensak) Células apoptóticas endoteliales positivas con TUNEL (flecha) (dosis UVA endotelial de 0,65 J/cm²), magnificación original x 100, inmersión en aceite).

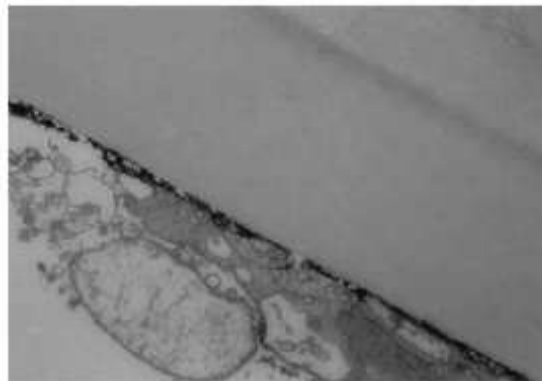


Figura 4. (Wollensak) Células endoteliales apoptóticas con cuerpos apoptóticos y cromatina de condensación (TEM, magnificación original x 2800) (dosis UVA endotelial de 0,65 J/cm²).

Paquimetría

El grosor corneal medio fue de 400 μm \pm 20 (SD).



Discusión

Este estudio mostró un umbral de efecto citotóxico del tratamiento combinado de riboflavina-UVA en el endotelio corneal, comenzando en una dosis de UVA endotelial de 0,65 J/cm² (0,36 mW/cm²). Utilizando el coeficiente de absorción de 53⁻¹, que encontramos previamente en las mediciones de transmisión después del tratamiento con riboflavina,² se puede calcular que en las córneas humanas más delgadas a 400 μm, la irradiación UVA endotelial de 0,36 mW/cm² se alcanza utilizando la superficie de irradiación estándar de 3,0 mW/cm².

Afortunadamente, el umbral citotóxico no se alcanza en córneas normales con un grosor corneal promedio de 540 μm, o en la mayoría de pacientes con queratocono (410 a 470 μm).⁹

Sin embargo, en las úlceras corneales y en queratoconos avanzados, el adelgazamiento corneal podría ir más allá de este límite. En tales casos, debería de evitarse el tratamiento de riboflavina/UVA y deberían considerarse métodos alternativos, como el transplante de la membrana amniótica para las úlceras, o la queratoplastia para el queratocono.

Alternativamente, en córneas más delgadas de al menos 350 μm de grosor corneal, una superficie reducida de dosis UVA de 3,6 J/cm² (2 mW/cm²), que es la dosis más baja para producir un efecto de resistencia¹ y aumentar la resistencia de digestión enzimática,⁴ podría intentarse con mucha precaución; la dosis de UVA endotelial sería entonces de 0,54 J/cm² (0,3 mW/cm²). Del mismo modo, el tratamiento podría utilizarse en los pacientes con queratocono y con un adelgazamiento extremo en tan solo un área pequeña, ya que la pérdida de células endoteliales en un área pequeña podría compensarse mediante la migración de las células endoteliales sin daño adyacentes.

El efecto citotóxico observado en el endotelio pareció deberse al efecto combinado de UVA y de riboflavina fotosensibilizadora, con incrementos de absorción de UVA en la córnea hasta 95%,² en comparación con el 32% sin riboflavina.¹⁰ De experimentos de irradiación in vivo en ojos de animales, se conoce que la sola irradiación de UVA (320 a 400 nm), puede inducir daño de las células endoteliales solo después de una superficie de dosis de UVA relativamente alta de 42,5 J/cm² (5,4 J/cm² en nuestro experimento).^{11,12} Adicionalmente, en los experimentos de culturas de células con un tratamiento combinado de riboflavina/luz, se observó un efecto citotóxico significativo sobre las células endoteliales corneales de bovino después de la instilación de una mínima cantidad de solución de riboflavina de 50 μM y 2 horas de irradiación con luz blanca; la riboflavina o la luz blanca por sí solas no produjeron daño en las células.⁷

También se informó de daño endotelial en casos con queratitis solar¹³ con una superficie de dosis de Ultravioletas-B (UVB) entre 0,12 y 0,56 J/cm².¹⁴ En las córneas de conejo expuestas a 310 nm de UVB con 0,47 J/cm², se encontraron células endoteliales positivas con la técnica TUNEL, 24 horas más tarde.¹⁵ El extenso daño después de la exposición UVB, se explica por la longitud de onda más corta de los rayos UVB, con su correspondiente alto contenido de energía.

En los animales matados a las 4 horas no se observaron células endoteliales apoptóticas, mientras que 24 horas más tarde, se encontró un máximo daño citotóxico, tal como se describe después de la irradiación UVA; este tipo de apoptosis denominado apoptosis con retraso¹⁵⁻¹⁸ contrasta con el tipo inmediato de apoptosis observado en los queratocitos después de la abrasión corneal.^{19,20}

En conclusión, este estudio demostró que el tratamiento combinado de riboflavina/UVA, debería ser seguro para el endotelio, siempre y cuando la dosis sea menor que la dosis citotóxica endotelial de 0,65 J/cm². En las córneas humanas, la dosis UVA citotóxica endotelial, solo puede alcanzarse en córneas más delgadas a 400 μm. Por lo tanto, deben



realizarse mediciones paquimétricas rutinariamente antes del tratamiento de riboflavina/UVA, para identificar los casos que no son adecuados para el tratamiento.

Referencias

1. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998; 66:97–103
2. Spoerl E, Schreiber J, Hellmund K, et al. Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen. *Ophthalmologe* 2000; 97:203–206
3. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine cornea after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29:1780–1785
4. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Resistance of riboflavin-UVA-treated cornea against enzymatic digestion. In press, *Curr Eye Res*
5. 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
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 Monatsbl Augenheilkd* 2000; 217:190–193
7. Cho K-S, Lee EH, Choi J-S, Joo C-K. Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 911–919
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. Watters GA, Owens H. Evaluation of mild, moderate, and advanced keratoconus using ultrasound pachometry and the EyeSys videokeratoscope. *Optom Vis Sci* 1998; 75:640–646
10. Michael R. Development and repair of cataract induced by ultraviolet radiation. *Ophthalmic Res* 2000; 32(suppl 1)
11. Pitts DG, Cullen AP, Hacker PD. Ocular effects of ultraviolet radiation from 295 to 365 nm. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16:932–939
12. Ringvold A, Davanger M, Olsen EG. Changes of the cornea endothelium after ultraviolet radiation. *Acta Ophthalmol* 1982; 60:41–53
13. Blumthaler M, Ambach W, Daxecker F. On the threshold radiant exposure for keratitis solaris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28:1713–1716
14. Olsen EG, Ringvold A. Human cornea endothelium and ultraviolet radiation. *Acta Ophthalmol* 1982; 60:54–56
15. Podskochy A, Gan L, Fagerholm P. Apoptosis in UVexposed rabbit corneas. *Cornea* 2000; 19:99–103
16. Godar DE, Miller SA, Thomas DP. Immediate and delayed apoptotic cell death mechanisms: UVA versus UVB and UVC radiation. *Cell Death Differ* 1994; 1:59–66
17. 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
18. Pourzand C, Tyrrell RM. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol* 1999; 70:380–390
19. Wilson SE, He Y-G, Weng 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
20. Helena MC, Baerveldt F, Kim W-J, Wilson SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:276–283

Fuente: *J Cataract Refract Surg* 2003; 29:1786–1790 © 2003 ASCRS y ESCRS

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. "