



## MEDICIONES DE TENSIÓN – PRESIÓN EN CÓRNEAS HUMANAS Y DE CERDO, DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN DE UN CROSS-LINKING DE COLÁGENO CON RIBOFLAVINA / RAYOS ULTRAVIOLETA - A

Dr. Gregor Wollensak, Prof. Eberhard Spoerl, Prof. Theo Seiler

**Propósito:** Evaluar el efecto biomecánico del tratamiento combinado de riboflavina – rayos ultravioleta (UVA) en córneas de cerdo y humanas.

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

**Métodos:** Se trataron 5 tiras de ojos humanos enucleados y 20 córneas de cerdos muertos, con riboflavina fotosensibilizadora e irradiación con 2 diodos de UVA dobles (370 nm, 3mW/cm<sup>2</sup>) durante 30 minutos. Después del cross-linking, se realizaron mediciones estáticas de tensión – presión en las córneas tratadas y no tratadas, utilizando un tester biomaterial controlado con un micro ordenador, con una tensión prefijada de  $5 \times 10^3$  Pa.

**Resultados:** Después del cross-linking hubo un incremento significativo en la rigidez corneal, mediante un aumento en la tensión en las córneas de cerdo (en 71,9%) y en las córneas humanas (en 328,9%) y el módulo de Young con un factor de 1,8 en las córneas de cerdo y de 4,5 en las córneas humanas. El grosor central corneal medio fue de 850  $\mu$ m  $\pm$ 70 (SD) en las córneas de cerdo y 550  $\pm$ 40  $\mu$ m en las córneas humanas.

**Conclusiones:** El cross-linking de colágeno inducido con riboflavina – UVA, provocó un incremento en la rigidez mecánica en las córneas de cerdo, e incluso un mayor incremento en las córneas humanas. Debido que el cross-linking de colágeno es máximo en las 300  $\mu$ m anteriores de la córnea, el efecto de fortalecimiento en las córneas es la razón del fortalecimiento total de la córnea humana más delgada, mediante la porción relativamente más grande de la córnea que se somete al cross-linking.

*J Cataract Refract Surg 2003; 29:1780–1785 © 2003 ASCRS y ESCRS*

Las propiedades biomecánicas de la córnea, se determinan principalmente por las fibras de colágeno, comprendiendo 15.000 Km y el grado de vínculo interfibrilar.<sup>1</sup> Por lo tanto, el crosslinking inducido mediante un tratamiento combinado de riboflavina y rayos ultravioleta A (UVA), se ha utilizado exitosamente para estabilizar mecánicamente la córnea en el queratocono (y, por lo tanto, deteniendo la progresión de la queratectasia<sup>2</sup>) y el proceso de deterrimiento corneal<sup>3</sup>. Clínicamente, no se han observados efectos adversos.<sup>2</sup>

Sin embargo, no se han realizado mediciones experimentales biomecánicas del efecto del tratamiento combinado de riboflavina-UVA en las córneas humanas.<sup>4,5</sup>

Este estudio midió el efecto biomecánico del cross-linking de colágeno inducido con riboflavina- UVA en las córneas humanas y lo comparó con el efecto en las córneas de cerdo sometidas al cross-linking, que tienen propiedades biomecánicas comparables.<sup>6,7</sup>

### Materiales y Métodos

#### *Preparación del Espécimen*

Se utilizaron 5 ojos humanos enucleados, con Intacs y córneas transparentes, que se extrajeron debido a una endoftalmitis (1 paciente), melanoma coroidal (3 pacientes) y desprendimiento de la retina sin curación (1 paciente), a las 1 - 2 horas después de la enucleación. Antes del tratamiento, se raspó completamente el epitelio corneal con un cuchillito hockey despuntado. Se marcó la posición de las 12 horas con un hilo de nylon para la orientación del corte superior-inferior. Se extrajo el anillo corneoescleral. Con un escalpelo de triple cuchilla de fabricación propia, se cortó la córnea en 2 tiras iguales de 4,0

mm de ancho, 550  $\mu\text{m}$  de grosor corneal y 14,0 mm de longitud, incluyendo 1,0 mm de esclera en ambos extremos. No se incluyeron ojos de cadáver humano que habían medido, ya que las variaciones en las mediciones de tensión-presión eran muy grandes debido a los diferentes tiempos post mortem y de grado de autolisis.

Se retiraron 20 ojos frescos de cerdo del matadero con epitelio intacto y córneas transparentes, a las 2 - 5 horas después de la muerte. Mecánicamente se desepitalizaron los ojos y se extrajo el anillo corneoescleral con unas tijeras. Con un escalpelo mecánico de doble cuchilla y de fabricación propia, se cortó el ojo de una manera superior-inferior desde la posición de las 12 h de la córnea, fácil de identificar, debido a la forma oval del ojo. Se cortó una tira corneal de 5,0 mm de ancho, 850  $\mu\text{m}$  de grosor corneal central y 14,0 mm de longitud, incluyendo 1,0 mm de esclera en ambos extremos. Debido al grosor natural de la córnea de cerdo, solo se utilizó una tira corneal con corte de bordes claramente perpendiculares. Por otro lado, hubo artefactos cortantes en las capas más profundas. Se trataron 10 córneas con riboflavina e irradiación de UVA y 10 ojos fueron utilizados como controles sin tratar.

#### *Paquimetría*

En los ojos de cerdo y de humano, se determinó el grosor corneal central utilizando un paquímetro de ultrasonido (Pachette, Technomed).

#### *Tratamiento*

5 minutos antes del tratamiento, se aplicó solución de riboflavina fotosensibilizadora al 0,1% (vitamina B2) (10 mg de riboflavina - 5- fosfato en 10 mL de dextran - T - 500 al 20%) en las tiras a tratar y solución de dextran al 20% en las tiras de control, en intervalos de 5 minutos.

Se aplicó durante 30 minutos una irradiación de rayos Ultravioleta A (370 nm), utilizando dos diodos de UVA dobles (Roithner Lasertechnik) con una irradiación de 3 mW/cm<sup>2</sup>, a una distancia de 1,0 cm de la córnea (**Figura 1**). Esto equivale a una dosis de 5,4 J/cm<sup>2</sup>. Los parámetros de la exposición se seleccionaron de acuerdo al procedimiento del tratamiento utilizado en pacientes con queratocono.<sup>2</sup>

Se utilizaron 3 acumuladores de 1,3 V como generadores de energía. Antes del tratamiento, se controló la irradiación de 3mW/cm<sup>2</sup> con un calibrador UVA (LaserMate-Q, Laser 2000), a una distancia de 1,0 cm y, en caso de que fuese necesario, regulado con un potenciómetro.

## **Resultados**

#### *Curvas de Tensión - Presión*

Las curvas de tensión-presión, mostraron un incremento exponencial típico de un sólido bioviscoelástico (**Figura 3**). En las córneas de cerdo, la presión utilizando una tensión de 6%, fue de 98.5 +- 29.77 X 10<sup>3</sup> Pa en las córneas tratadas, y de 57.3 +-17.3 X 10<sup>3</sup> Pa en las córneas sin tratar, correspondiendo a un incremento de 71,9% (**Tabla 1**). La diferencia fue estadísticamente significativa ( $P = .014$ ).

En las córneas humanas, la presión utilizando una tensión de 6%, fue de 227.3 +-95.7 X 10<sup>3</sup> Pa en las córneas tratadas y de 53.0 +-11.5 X 10<sup>3</sup> Pa en las córneas sin tratar, correspondiendo a un incremento de 328,9% (**Tabla 1**). La diferencia fue estadísticamente significativa ( $P = .012$ ). En las córneas sin tratar de ojos de cerdo y humanos, la diferencia en los valores de tensión-presión no fue estadísticamente significativa ( $P = .87$ ). En las córneas de cerdo y humanas tratados, la diferencia fue estadísticamente significativa ( $P = .01$ ). El incremento en la rigidez biomecánica también se reflejó en los diferentes comportamientos de flexibilidad (**Figura 4**).

### Módulo de Young

Para calcular el módulo de Young, los valores de tensión-presión se ajustaron a una función exponencial  $\sigma = A \exp(B \times \epsilon)$ . La primera derivación de esta función en una tensión definida, es el módulo de Young  $E = d\sigma/d\epsilon = A \times B \exp(B \times \epsilon)$ .

En las córneas de cerdo a una tensión de 6%, el módulo de Young fue de  $1,5 \times 10^6$  Pa en los ojos sin tratar y  $2,7 \times 10^6$  Pa en los ojos tratados (factor de incremento de 1,8). En las córneas humanas a una tensión del 6%, el módulo de Young para los ojos sin tratar fue de  $1,3 \times 10^6$  Pa y de  $5,9 \times 10^6$  Pa en los ojos tratados (factor de incremento de 4,5).

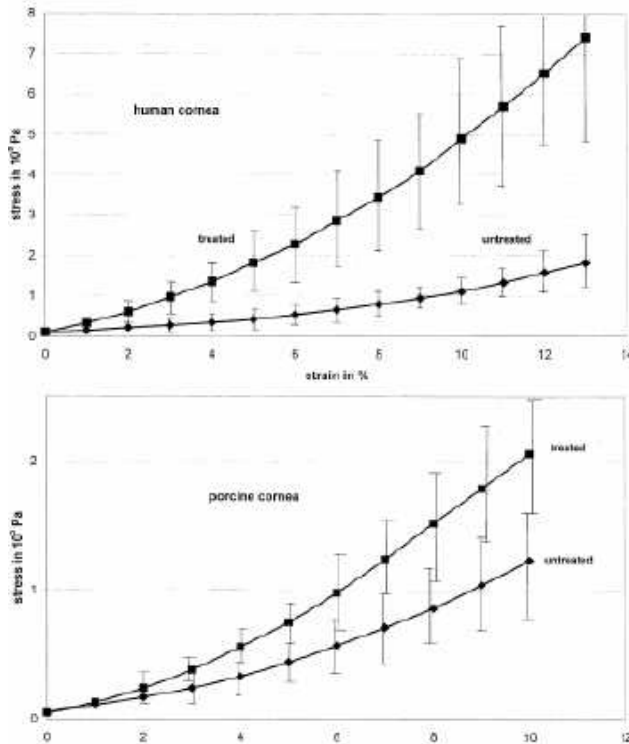


Figura 3. (Wollensak) Superior: mediciones de tensión-presión en córneas humanas (n=5) tratadas con riboflavina-UVA (irradiación = 3 mW/cm<sup>2</sup>). Inferior: Mediciones de tensión-presión en córneas de cerdo (n=20) tratadas con riboflavina-UVA (irradiación = 3 mW/cm<sup>2</sup>).

Tabla 1. Valores de tensión para una tensión de 4%, 6%, y 8% y cálculo del módulo de Young entre paréntesis.

Tipo de Córnea	Tensión a 4% ( $10^8$ Pa)	Tensión a 6% ( $10^8$ Pa)	Tensión a 8% ( $10^8$ Pa)
<b>Cerdo</b>			
Sin tratar	33.7±9.3 ( $E=0.8 \times 10^6$ Pa)	57.3±17.3 ( $E=1.5 \times 10^6$ Pa)	86.5±29.9 ( $E=2.6 \times 10^6$ Pa)
Tratadas	55.8±17.6 ( $E=1.4 \times 10^6$ Pa)	98.5±29.7 ( $E=2.7 \times 10^6$ Pa)	151.8±44.7 ( $E=5.3 \times 10^6$ Pa)
<b>Humana</b>			
Sin tratar	34.3±5.5 ( $E=0.8 \times 10^6$ Pa)	53.0±11.5 ( $E=1.3 \times 10^6$ Pa)	79.3±21.2 ( $E=2.2 \times 10^6$ Pa)
Tratadas	135.7±61.4 ( $E=3.0 \times 10^6$ Pa)	227.3±95.7 ( $E=5.9 \times 10^6$ Pa)	344.7±141.9 ( $E=11.8 \times 10^6$ Pa)

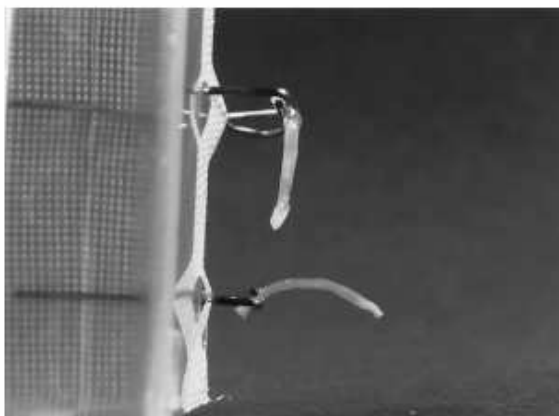


Figura 4. (Wollensak) Tiras corneales de cerdo sin tratar (superior) y tratadas (inferior) conservando la curvatura corneal en la córnea tratada, debido al incremento en la rigidez de la flexibilidad mediante el cross-linking de colágeno.

### *Paquimetría*

El grosor corneal central medio fue de 850  $\pm$  70  $\mu$ m en los ojos de cerdo y 550  $\pm$  40  $\mu$ m en los ojos humanos.

### **Discusión**

Después de la inducción del cross-linking de colágeno con riboflavina/UVA, encontramos un incremento significativo en la rigidez biomecánica de las córneas humanas, con un factor de 4,5, tal como se indica en el módulo de Young. El incremento en la rigidez biomecánica en los ojos de cerdo también fue significativa, pero solo con un factor de 1,8.

Este incremento en la rigidez biomecánica en las córneas humanas fue sorprendentemente alto.

De las mediciones previas en los ojos de cerdo, utilizando condiciones de tratamiento ligeramente diferentes (ej., tiempo de tratamiento (45 minutos), fuente de irradiación de UVA (lámpara de mercurio con filtro UVA de 365 nm), irradiación de UVA (2 mW/cm<sup>2</sup>)), esperábamos un incremento en el rango de factor 2, tal como se encontró en los ojos de cerdo de este estudio.<sup>4</sup>

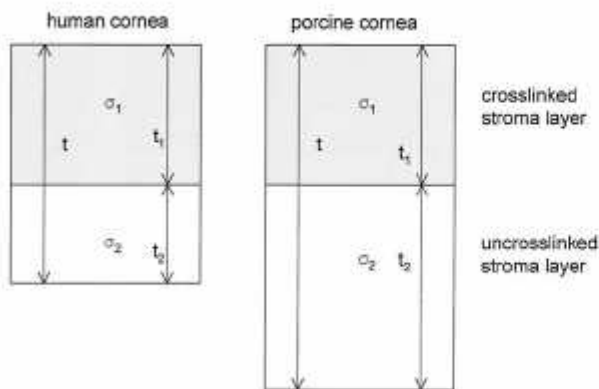
De otros experimentos en el diámetro de las fibras de colágeno corneales,<sup>8</sup> resistencia a la digestión enzimática<sup>9</sup> y pérdida de queratocitos después del tratamiento de riboflavina - UVA,<sup>9,10</sup> sabemos que los efectos del cross-linking y citotóxicos son significativamente más altos en la porción anterior de la córnea. Esto se causa por el incremento significativo en la absorción de los rayos UVA por la riboflavina, provocando una rápida reducción de la irradiación UVA y del cross-linking de colágeno a través de la córnea.<sup>11</sup>

Dada la distribución irregular del cross-linking de colágeno, con un efecto máximo de crosslinking en las 300  $\mu$ m anteriores del estroma corneal, en este aspecto las córneas tratadas pueden considerarse como estructuras de 2 capas. La porción anterior tiene un volumen de cross-linking de 35% en las córneas de cerdo (300  $\mu$ m/ 850  $\mu$ m) y un volumen de 54% en las córneas humanas (300  $\mu$ m/550  $\mu$ m), provocando una mayor rigidez en la córnea total de los ojos humanos, tal como se refleja en las mediciones de tensión-presión (**Figuras 3 y 5**). En los ojos normales, el estroma anterior más rígido también es el que mantiene la curvatura corneal.<sup>12,13</sup>

La localización anterior del efecto principal de cross-linking, tiene la ventaja de permitirnos alcanzar un incremento relativamente alto en la rigidez corneal en los ojos humanos, debido al grosor relativamente pequeño de la córnea humana y evitando daño citotóxico del endotelio y el cristalino, teniendo en cuenta que el estroma corneal es normalmente grueso.

Para evitar desigualdades adicionales del cross-linking en las dimensiones horizontales, la irradiación se realizó sobre la longitud total de las tiras corneales, utilizando 2 diodos UVA dobles, mientras que en aplicaciones clínicas, irradiamos sólo la córnea central utilizando 1 diodo UVA doble.<sup>2</sup>

Probablemente, el aumento en la rigidez biomecánica después del cross-linking en las córneas humanas y de cerdo, se causa por el incremento en el diámetro de las fibras de colágeno, debido a los cross-links intrafibrilares.<sup>8</sup>



**Figura 5.** (Wollensak) Modelo de dos capas de una córnea sometida al cross-linking y un estroma corneal posterior sin cross-linking. En las córneas de cerdo, la porción relativa de la córnea con cross-linking ( $t_1/t$ ) es menor que en los ojos humanos, debido al mayor grosor corneal de los ojos de cerdo ( $850 \mu\text{m}$ , vs.  $550 \mu\text{m}$ ), provocando menor rigidez para la córnea total de cerdo (indicada por una  $\sigma_{\text{total}}$  menor) ( $\sigma =$  tensión total de la córnea,  $\sigma_1 =$  tensión parcial de la capa de la córnea con cross-linking,  $\sigma_2 =$  tensión parcial de la capa de la córnea sin cross-linking,  $t =$  grosor total de la córnea,  $t_1 =$  grosor parcial de la capa de la córnea con cross-linking,  $t_2 =$  grosor parcial de la capa de la córnea sin cross-linking;  $\sigma = \sigma_1 \times t_1/t + \sigma_2 \times t_2/t$ ).

Otros métodos de cross-linking que han sido probados exitosamente in vitro, tienen un efecto biomecánico en la córnea comparable con el tratamiento de riboflavina-UVA, pero no pueden utilizarse clínicamente, debido al desarrollo de haze corneal y cicatrización, como el tratamiento con glutaraldehído (W.J. Dupps, ARVO abstract 147, 2002),<sup>14</sup> o por problemas de aplicación y tiempos de tratamiento prolongados, como el gliceraldehído (F.J. Tessier, ARVO abstract 3234, 2002).<sup>14</sup>

En el queratocono, se ha encontrado que es necesaria una disminución del 50% de la tensión para una tensión definida.<sup>15</sup> De acuerdo con esto, hemos utilizado un tratamiento de crosslinking principalmente en el queratocono progresivo y con menos frecuencia en los procesos de "melting" corneal. Más aplicaciones recaen en el campo de la Cirugía Refractiva y se han estado explorando en condiciones tales como queratectasia iatrogénica después de un láser in situ keratomileusis (LASIK)<sup>16,17</sup> o para tratamiento preventivo antes de un LASIK para miopía alta, para evitar o reducir la posible regresión miópica o la queratectasia.

El cross-linking de colágeno también podría ayudar a evitar las llamadas islas centrales en la cirugía láser con haces amplios (W.J. Dupps, ARVO abstract 147, 2002), causadas normalmente por la hidratación corneal diferencial,<sup>18</sup> que se reduce marcadamente después del cross-linking (E. Spoerl, ARVO abstract 2339, 1997).

En conclusión, después del tratamiento con riboflavina-UVA, el presente estudio demostró un incremento más potente en la rigidez biomecánica de la córnea humana, que en la córnea de cerdo, debido a la porción relativamente más grande de cross-linking en la córnea humana más delgada. Las aplicaciones prácticas de este nuevo método son el queratocono progresivo, procesos de "melting" corneal y LASIK en miopía alta.



## Referencias

1. Maurice DM. Mechanics of the cornea. In: Cavanagh HD, ed. *The Cornea*; Transactions of the World Congress on the Cornea III. New York, NY, Raven, 1988; 187–193
2. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet- A-induced cross-linking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135:620–627
3. 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
4. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998; 66:97–103
5. Spoerl E, Huhle M, Kasper M, Seiler T. Erhöhung der Festigkeit der Hornhaut durch Vernetzung. *Ophthalmologe* 1997; 94:902–906
6. Zeng Y, Yang J, Huang K, et al. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *J Biomech* 2001; 34:533–537
7. Kampmeier J, Radt B, Birngruber R, Brinkmann R. Thermal and biomechanical parameters of porcine cornea. *Cornea* 2000; 19:355–363
8. Wollensak G, Seiler T, Wilsch M, Spoerl E. Collagen fiber—diameter after riboflavin/UVA induced collagen crosslinking in the rabbit cornea. In press, *Cornea*.
9. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of riboflavin/UVA-treated cornea against enzymatic digestion. In press, *Curr Eye Res*
10. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavin–ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29:1786–1790
11. Spoerl E, Schreiber J, Hellmund K, et al. Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen. *Ophthalmologe* 2000; 97:203–206
12. Müller LJ, Pels E, Vrensen GFJM. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:437–443
13. Bron AJ. The architecture of the corneal stroma (editorial). *Br J Ophthalmol* 2001; 85:379–381
14. Spoerl E, Seiler T. Techniques for stiffening the cornea. *J Refract Surg* 1999; 15:711–713
15. Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1980; 31:435–441
16. Seiler T. Iatrogenic keratectasia: academic anxiety or serious risk? (editorial) *J Cataract Refract Surg* 1999; 25:1307–1308 2001; 27:1440–1448
18. Kim W-S, Jo J-M. Corneal hydration affects ablation during laser in situ keratomileusis surgery. *Cornea* 2001; 20:394–397

**Fuente: J CATARACT REFRACT SURG—VOL 29, Nº 9, Septiembre 2003:1786–1790**

**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. "