



Centro de Cirugía de Mínima Invasión  
Minimally Invasive Surgery Centre

*Jesús Usón*

2014



ELENA ABELLÁN RUBIO

CROSSLINKING CORNEAL: ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA EVOLUCIÓN DE LOS  
CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y TOPOGRÁFICOS EN CÓRNEA DE CONEJO

UNIVERSIDAD  DE EXTREMADURA

TESIS DOCTORAL

CROSSLINKING CORNEAL:  
ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA  
EVOLUCIÓN DE LOS CAMBIOS  
MORFOLÓGICOS Y TOPOGRÁFICOS EN  
CÓRNEA DE CONEJO

ELENA ABELLÁN RUBIO

Departamento de Medicina Animal: Facultad de Veterinaria, UEX.

2014



Centro de Cirugía de Mínima Invasión  
Minimally Invasive Surgery Centre  
*Jesús Usón*

GOBIERNO DE EXTREMADURA  
Consejería de Empleo, Empresa e Innovación





## **TESIS DOCTORAL**

### **CROSSLINKING CORNEAL: ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA EVOLUCIÓN DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y TOPOGRÁFICOS EN CÓRNEA DE CONEJO**

Elena Abellán Rubio

Departamento de Medicina Animal. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura

Conformidad de los Directores:

Fdo. Dr. Francisco M.  
Sánchez Margallo

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> del Carmen  
Calles Vázquez

Fdo. Dr. Luis Cadarso Suárez

2014



*“Al carro de la cultura española le falta la rueda de la ciencia”*

*Ramón y Cajal (1852-1934)*

*“Más de cien motivos...”*



A mis padres,

Por el tiempo perdido sin estar a vuestro lado. Me habéis enseñado a superar dificultades y a tener fe en mi misma. Por todos los valores que me habéis enseñado. Por vuestra generosidad, paciencia y cariño. No puedo imaginar unas personas más buenas en el mundo. Gracias...os quiero.



# AGRADECIMIENTOS

---

A Carmen Calles, porque he tenido la suerte de poder conocerla más allá de esa “fachada castellana”. Por ser un ejemplo de superación. Por creer en mí y pelear contra mis inseguridades. Gracias...muchas gracias.

A Jesús Usón, por su lucha incansable por cada uno de nosotros. Por dedicarme todas las horas que necesité y porque nunca le podré devolver todo lo que me ha dado de forma desinteresada.

A Francisco M. Sánchez, por apostar por mí y por esta línea de investigación.

A Luis Cadarso, porque ha ampliado mi amor por este apasionante y desconocido mundo que es la oftalmología.

A Rafael Latorre, por darme todo desde el primer día, hace ya 17 años. Por su entrega, su pasión y su lucha por la enseñanza. Porque le debo el pertenecer a esta maravillosa profesión.

A mi hermana Sonia, por mantener mi cordura estos 8 años lejos de mi tierra. Por acompañarme en mis viajes con su voz. A mi hermana Laura, por hacerme perder esa cordura y hacerme reír hasta no poder respirar. Ambas me han enseñado que aunque todo esté negro nuestra vida la pintamos nosotros del color que queramos.

A mi abuela Milagros y a mi tía Mari, por cada lágrima derramada que he visto por el retrovisor de mi coche. A mi abuelo José María y a mi abuela Ángeles, no están aquí pero los siento conmigo cada día. A mi abuelo Luis (porque siempre tendré esa parte incompleta) que no pude llegar a conocer pero se ha sentado a mi lado muchas noches. A mi tío Antonio para que sonría una vez más allá donde esté.

A mi sobrina Irati, por recordarme la pureza de la vida y la esperanza de un futuro mejor.

A Manuel, por estar cerca de mi pese a la distancia en espacio y tiempo. Por cambiar el sentido de las calles, por fabricar un castillo para mí, por compartir mis sueños y haberme facilitado hacer realidad muchos de ellos. Hasta que deje de latir.

A Álex, mi alegría. Por recordarme que nunca dejamos de llevar un niño dentro. Gracias por darme siempre una sonrisa.

A Bere, mi tranquilidad. Por obligarme a parar y a valorar la importancia de un segundo de paz. Gracias por cogerme de la mano y llevarme a sitios más apacibles con tu voz.

A María, mi fuerza. Por ser un ejemplo de lucha constante ante todas las adversidades que se presentan. Gracias por prestarme tu fortaleza para enfrentarme a todo.

A Alejandro Bayón, excelente persona para tener siempre cerca. Por ser el origen de mi pasión por la oftalmología.

A Octavio, M<sup>a</sup> Dolores, Mariano, Gregorio...a todo el departamento de Anatomía y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, personas únicas y maravillosas donde las haya.

A Federico Soria, por hacerme reflexionar sobre esta profesión. Por sus consejos profesionales y personales. Por su puerta siempre abierta.

## VIII

A Nando, por su paciencia conmigo y por haber conseguido que crea en mi misma.

A Enrique, Eva, Dani y Julia...por ser mi fuerza desde Murcia. Por estar siempre al otro lado del teléfono.

A Jesús Manuel, por tener siempre mi mente despierta y preparada ante cualquier debate, por sus ánimos en quirófano cuando las cosas no iban bien.

A Jorge Tato, por enseñarme cómo ser un buen veterinario y por recordarme que los títulos no hacen a las personas. A Anabel, por tener siempre un momento para escucharme. A Ana, por ese primer día inolvidable.

A Piti, porque sus abrazos hacen más llevaderos mis días. A Rafael Lima, por recordarme la belleza de nuestra profesión.

A Ferni, por llorar conmigo sin pedírselo.

A Juanjo y a Santiago, por estar a mi lado en esos primeros congresos en los que sólo quería que se abriese la tierra.

A Jose Antonio Usón, Katia Gracia, Ricardo Crisóstomo y Ángela Hernández. Por ser mis segundos padres, mis amigos...Gracias por vuestra cercanía.

A todos los colaboradores de la Unidad de Microcirugía, muy especialmente a Teresa Peña, Marta Leiva, Javier Mendicute, Julián Cezón, Francisco Arnalich, Itziar Martínez, Aritz Bidaguren, Javier González y Jesús M<sup>a</sup> Usón. La oftalmología es un mundo apasionante y gracias a personas como ellos conseguimos que se conozca un poco más.

A todos los técnicos de quirófano, anestesia, animalario y mantenimiento. Muchas gracias a todos. Sois imprescindibles, sois únicos y no dejéis que jamás nadie os diga lo contrario.

A Julia Anaya y a María Pérez, por sus diseños y sus fotografías.

A Alberto, Raquel, Javier, Laura, Miguel...a todo el personal del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón...porque estamos en el mismo barco.

A todos, gracias...muchas gracias.

# ABREVIATURAS

- AAO: Academia Americana de Oftalmología
- ATP: Adenosín trifosfato
- BAC: cloruro de benzalconio
- °C: grados centígrados
- CDVA: agudeza visual lejos corregida
- céls/mm<sup>2</sup>: células por milímetro cuadrado
- CK: Conductive Keratoplasty (Queratoplastia conductiva)
- cm: centímetro
- cm<sup>2</sup>: centímetro cuadrado
- CxL: Crosslinking
- D: dioptrías
- DLK: Diffuse Lamellar Keratitis (Queratitis lamelar difusa)
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- ERO: especies reactivas de oxígeno
- h: hora
- ICR: Intracorneal Rings (Anillos intracorneales)
- ICRS: Intracorneal Rings Segments (Segmentos de anillos intracorneales)
- J/cm<sup>2</sup>: julio por centímetro cuadrado
- KCl: cloruro potásico
- LASIK: Laser Assisted in situ keratomileusis (Queratectomía refractiva)
- LC-RPG: lentes de contacto rígidas permeables al gas
- LKP: Lamellar Keratoplasty (Queratoplastia lamelar)
- min: minuto
- mm: milímetro
- mm<sup>2</sup>: milímetro cuadrado
- mW/cm<sup>2</sup>: milivatios por centímetro cuadrado
- μm: micrómetro
- NaCl: cloruro sódico
- nm: nanómetro
- OCT: optical coherence tomography (tomografía de coherencia óptica)
- Ortho-K: Orthokeratology (Ortoqueratología)
- PBS: Phosphate Buffered Saline (Solución salina tamponada con fosfato)
- PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
- PIO: presión intraocular
- PKP: Penetrating Keratoplasty (Queratoplastia penetrante)
- PMMA: polimetilmetacrilato
- PRK: Photorefractive Keratectomy (Queratectomía refractiva)
- sg: segundo
- TKP: Thermokeratoplasty (Termoqueratoplastia)
- TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling
- UV: ultravioleta
- UVA: ultravioleta tipo A
- UVB: ultravioleta tipo B
- VKC: vernal conjunctivitis (conjuntivitis vernal)



# ÍNDICE

<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>II. Revisión Bibliográfica</b>	<b>3</b>
<i>Modelo animal. Recuerdo anatómico de la córnea</i>	3
<i>Ectasias corneales</i>	4
Biomecánica de la córnea ectásica	5
Queratocono	5
Ectasia postquirúrgica	7
<i>Técnicas de modelado corneal</i>	8
Ortoqueratología (Orthokeratology)(Ortho-K)	8
Termoqueratoplastia (TKP)	9
Queratoplastia Conductiva (CK)	10
Segmentos intracorneales	11
Queratectomía refractiva (photorefractive keratectomy) (PRK) / (LASIK)	12
<i>Técnicas de tratamiento de la córnea ectásica</i>	12
Queratoplastia lamelar (lamellar keratoplasty) (LKP)	12
Queratoplastia penetrante (penetrating keratoplasty) (PKP)	13
Segmentos intracorneales	13
Asociación de técnicas	14
<i>Nuevas tendencias</i>	15
Crosslinking Corneal (Reticulación corneal) (CxL)	15
Profundidad del tratamiento	16
Citotoxicidad del tratamiento	18
Riesgo térmico del tratamiento	20
Modificación en la resistencia	21
Uso de la riboflavina	23
Complicaciones del tratamiento	26
Indicaciones del tratamiento	29
<b>III. Material y Métodos</b>	<b>37</b>
<i>Material</i>	37
<i>Método</i>	38
Justificación del método	38
<i>Planteamiento experimental</i>	40

<b>IV. Resultados</b>	<b>47</b>
<i>Queratometría</i>	47
<i>Topografía corneal</i>	53
<i>Análisis histológico</i>	59
<b>V. Discusión</b>	<b>65</b>
<i>Futuras líneas de trabajo</i>	74
<b>VI. Conclusiones</b>	<b>77</b>
<b>VII. Resumen</b>	<b>79</b>
<b>VIII. Summary</b>	<b>81</b>
<b>IX. Bibliografía</b>	<b>83</b>
<b>X. Trabajos más relevantes del doctorando relacionados con la temática de la tesis Doctoral</b>	<b>97</b>

# I. Introducción

---

La aplicación de los tratamientos actuales para las ectasias corneales, tales como las queratoplastias lamelares o penetrantes, la inserción de anillos intraestromales, ortoqueratología, etc., ha significado una mejora substancial para los pacientes que sufren esta patología.

Las ectasias corneales, tanto las patológicas como las iatrogénicas, han adquirido especial relevancia en los últimos años gracias a las nuevas tecnologías (topógrafos corneales, tomografía de coherencia óptica, etc.), y a que cada vez es mayor el número de pacientes que se someten a cirugía refractiva corneal. Principalmente por estas dos razones, han sido objeto de numerosas técnicas quirúrgicas. No obstante la mayoría de tratamientos usados en la actualidad son de carácter temporal dado que se limitan a corregir los errores refractivos producidos por la ectasia, en ningún momento se trata la causa subyacente de la alteración y, en consecuencia, la córnea sigue adelgazando progresivamente.

En la búsqueda de una solución para esta limitada temporalidad surge un nuevo tratamiento, el tratamiento crosslinking, basado en incrementar la rigidez del colágeno corneal, atacando así la base de la patología ectásica. Consecuentemente, esta nueva técnica aumenta la resistencia a la ectasia y a la digestión por enzimas colagenasas.

Los estudios de los diferentes grupos de trabajo en este campo a nivel mundial, nos han servido para evaluar la viabilidad y efectividad de la técnica y su seguridad para el paciente. Sin embargo, y a pesar de los resultados satisfactorios de estos trabajos, existen algunas lagunas e interrogantes

que creemos necesario resolver sobre todo para conseguir una extrapolación a los pacientes humanos sin riesgo alguno.

Así, el desarrollo de este estudio experimental se plantea con el fin de evaluar los siguientes objetivos:

1. Evaluación de los efectos de la aplicación de luz ultravioleta (UVA) con riboflavina sobre la córnea de conejos a corto, medio y largo plazo (18 meses).
2. Analizar la profundidad hasta la que se produce el fenómeno de “crosslinking” en la córnea, en modelo experimental.

En conformidad con lo anteriormente expuesto, creemos necesario centrar nuestra hipótesis de trabajo en analizar en mayor profundidad los efectos provocados por el tratamiento crosslinking a largo plazo. Consideramos que es una técnica prometedora que está demostrando una reducción del tiempo del paciente en quirófano y, por tanto, el riesgo anestésico que conlleva una cirugía, la disminución de las estancias hospitalarias con la consiguiente reducción de gastos sanitarios, y, sobre todo, la reducción de la probabilidad de aparición de nuevas ectasias al ser un tratamiento de tipo permanente. Dado que las ectasias son alteraciones complicadas de tratar dada su variabilidad casuística y que cada vez se dan con más frecuencia en la práctica clínica, creemos preciso obtener datos de la evolución del tratamiento crosslinking y su eficacia para poder situarla a la cabeza en las técnicas de elección como tratamiento de las córneas ectásicas.



## II. Revisión Bibliográfica

### MODELO ANIMAL. RECUERDO ANATÓMICO DE LA CÓRNEA

Para la realización de este estudio se ha seleccionado la especie cunícula por ser el modelo experimental de elección para desarrollo de estudios de oftalmología. La anatomía ocular se asemeja a la del ser humano, tanto en las capas corneales como en el espesor del estroma corneal, con lo que se pueden extrapolar los resultados fácilmente, teniendo siempre en cuenta que la regeneración y la cicatrización se producen de forma más rápida en el conejo, y que se debería aplicar un factor de conversión a la especie humana<sup>1</sup>.

La córnea de conejo ocupa aproximadamente el 30% del globo ocular<sup>2</sup> y tiene un aspecto elíptico que mide 15 mm horizontalmente y 14 mm verticalmente<sup>3</sup>. En la córnea humana también se da el aspecto elíptico (provocado por la esclera que actúa como una banda en las zonas superior e inferior); siendo más largo su diámetro horizontal (11,7 mm) que el vertical (10,6 mm)<sup>4</sup>.

A nivel microscópico en la córnea de conejo se diferencian solamente 4 capas, frente a las 5 capas que se distinguen en la especie humana<sup>4,5</sup>:

1. Epitelio queratinizado con un espesor de 30-40  $\mu\text{m}$ <sup>3</sup>. Estabiliza la película lagrimal y protege en los procesos de reparación del estroma corneal (asegura la integridad epitelial)<sup>1</sup>. El espesor del epitelio en la córnea humana alcanza las 50  $\mu\text{m}$  mientras que su funcionalidad es igual que la córnea del conejo<sup>4,5</sup>.

2. El estroma de la córnea del conejo es la porción más gruesa de la córnea (aproximadamente 450-550  $\mu\text{m}$ ), está compuesta por capas de fibras paralelas de colágeno<sup>3</sup>, entre las estrechas hendiduras de las laminillas de colágeno se observan fibroblastos muy aplanados, los queratocitos<sup>3</sup>. En la especie humana se mantiene

la misma estructura con un intervalo de grosor que oscila entre las 500-550  $\mu\text{m}$ <sup>4,5</sup>. En ambas especies sirve como estructura de apoyo para la superficie óptica anterior y para la superficie nutricional posterior<sup>3,6</sup>. Supone aproximadamente el 90% del espesor corneal y las fibras que la componen se disponen en láminas paralelas a la superficie lagrimal, proporcionando con este patrón la cualidad cristalina al tejido<sup>6,7</sup>. La orientación de las capas de las fibras de colágeno es un factor determinante para las propiedades mecánicas de la córnea<sup>7,8</sup>. También están presentes en el estroma glucosaminoglucanos (queratansulfato y condroitín sulfato) que forman puentes entre las fibras de colágeno<sup>6-10</sup>. El colágeno tipo I es la mayor macromolécula constituyente del estroma corneal, aunque los tipos de colágeno III, V y VI también están presentes<sup>10,11</sup>. Las fibrillas de colágeno de 32 nm y uniformemente espaciadas se organizan dentro de fibras (llamadas lamelas) de diferente grosor (1-2  $\mu\text{m}$ ) y anchura (5-100  $\mu\text{m}$ ) que se organizan en capas ortogonales entrelazadas a través del estroma<sup>11</sup>. Estas lamelas son más finas y más entrelazadas en el estroma anterior<sup>11</sup>.

3. La membrana de Descemet, con un espesor de 7-8  $\mu\text{m}$ , va variando constantemente, de tal forma que en los conejos adultos puede llegar a los 15  $\mu\text{m}$ <sup>1</sup>. Proporciona el apoyo fisiológico necesario para asegurar la transparencia corneal<sup>1</sup>. En la especie humana posee un grosor de entre 10-15  $\mu\text{m}$ , al igual que en el conejo, va aumentando de tamaño y grosor a lo largo de la vida<sup>4,5</sup>. Es la porción más resistente de la córnea y su función es la de dar soporte y adhesión a las células del endotelio<sup>4,5</sup>.

4. El endotelio, es una capa simple de células con la presencia de bombas de sodio ATP-asa que es imprescindible para mantener la córnea

transparente<sup>3</sup>. La densidad celular del endotelio en conejos de 6 semanas de edad es de 4100 céls/mm<sup>2</sup> y decrece a 2000 céls/mm<sup>2</sup> aproximadamente a la edad de 2 años<sup>12</sup>. De igual forma, en la especie humana es también una monocapa, y, como en la especie cunicula, disminuye su densidad exponencialmente desde las 5000 céls/mm<sup>2</sup> en el recién nacido<sup>13</sup> hasta las 3500 céls/mm<sup>2</sup> a los 5 años de edad y a 3000 céls/mm<sup>2</sup> a los 20 años<sup>14</sup>. Al igual que la membrana de Descemet su función es la de apoyo fisiológico<sup>4</sup>.

La especie humana, a diferencia de la especie cunicula, presenta además la membrana de Bowman<sup>4,7</sup>. Esta capa está localizada entre el epitelio externo y el estroma y su grosor oscila entre 8-14  $\mu\text{m}$ <sup>4</sup>. Está compuesta de fibras de colágeno y su función es mantener la forma de la córnea<sup>4</sup>.

A mediados del 2013, se descubre una nueva capa, a la que se ha denominado capa Dua, predescemética, acelular y con un espesor aproximado de  $10,15 \pm 3,6 \mu\text{m}$ <sup>15</sup>. Esta capa está compuesta principalmente por lamelas de colágeno (predominando el colágeno tipo I) dispuesta de forma longitudinal, transversal y oblicua<sup>15</sup>. A falta de estudios más detallados, su identificación puede llevar a entender mejor la biomecánica de la córnea y patologías corneales posteriores tales como el hidropesía aguda, descemetocel y distrofias predesceméticas<sup>15</sup>.

De forma macroscópica, la córnea se divide en 3 zonas: anillo óptico corneal, zona óptica central y zona de soporte periférico<sup>16</sup>.

El anillo óptico corneal es una zona de transición entre la córnea y la esclera, su función es aislar la córnea de las modificaciones esclerales que se produzcan<sup>16</sup>.

La zona óptica central corresponde a los 4 mm centrales de la córnea<sup>16</sup>. El radio de curvatura medio de la superficie anterior corneal es de 7,8 mm y el de la superficie posterior es de 6,5 mm<sup>16</sup>. La relación entre su cara anterior y su cara posterior condiciona el poder dióptrico corneal central

(42 dioptrías)<sup>16</sup>.

Por último, la zona de soporte periférico es la zona de transición entre el anillo óptico corneal y la zona óptica central<sup>4, 16</sup>.

Los estudios realizados en la córnea humana han demostrado que varía la resistencia de las láminas de colágeno en las distintas partes de la córnea y de un paciente a otro<sup>17, 18</sup>. Las zonas con menor resistencia son la central y la inferior<sup>4</sup>. Los pacientes con queratocono, degeneración marginal pelúcida y ectasia postquirúrgica presentan protrusión de la córnea en la parte central o inferior<sup>19-21</sup>. Los dos tercios posteriores de la córnea son más débiles que el tercio anterior<sup>8, 18</sup>. En este último, el colágeno está ampliamente entrecruzado aportando un fuerte soporte estructural a diferencia de la parte posterior de la córnea en la cual las láminas de colágeno se encuentran superpuestas con escaso entrecruzamiento y menor soporte<sup>8, 9, 18</sup>.

La córnea se comporta como una membrana elástica sometida a tensión por la presión intraocular (PIO), cambios en las características de resistencia o tensión de sus materiales pueden provocar cambios en su curvatura<sup>4</sup>.

## ECTASIAS CORNEALES

Las ectasias corneales son un grupo de enfermedades oculares que tienen en común<sup>22, 23</sup>:

- Adelgazamiento progresivo del espesor corneal.
- Aumento progresivo de la curvatura corneal.
- Protrusión corneal.
- Clínicamente no inflamatorias.
- Generalmente son bilaterales y asimétricas.

La arquitectura específica de la córnea es responsable de su estabilidad<sup>18</sup>. Esta estabilidad en la parte anterior del estroma corneal juega un importante papel en el mantenimiento de la curva-

tura corneal<sup>18</sup>. En la realización de queratectomías refractivas (donde se retira parte del estroma) o bien en la utilización del LASIK (Laser-Assisted in Situ Keratomileusis) (ablación superficial) se predisponen los problemas oculares como la ectasia corneal<sup>23, 24</sup>.

### *Biomecánica de la córnea ectásica*

Los estudios realizados que se han centrado en aclarar el por qué de las ectasias corneales refieren una rigidez corneal disminuida o bien, una resistencia mecánica disminuida que permite la protrusión del tejido<sup>7, 18, 20</sup>.

El avance en las tecnologías permite concretar a nivel microscópico los signos de la ectasia corneal; las fibras de colágeno pierden su arquitectura natural y se altera su entrecruzamiento provocando esa debilidad corneal que conlleva comúnmente a la protrusión de la córnea<sup>7, 18, 20</sup>.

Las ectasias corneales pueden desencadenarse de modo natural o de forma iatrogénica<sup>24</sup>. De la gran variedad de ectasias corneales descritas, la mayor parte de los trabajos existentes en este campo se han centrado en las dos más frecuentes dada su repercusión en la clínica diaria: el queratocono y la ectasia postquirúrgica.

### Queratocono

El queratocono es una distrofia corneal no inflamatoria, de progresión lenta y que está caracterizada por cambios en la estructura de las fibras de colágeno y en la organización de las mismas<sup>22, 23</sup>. Con una frecuencia en la población general considerable (1/2000), es la queratectasia corneal por excelencia, suele aparecer en la pubertad y su tasa de progresión es muy variable y poco predecible<sup>22, 23</sup>. Aproximadamente el 20% de los casos progresa hasta el grado de requerir la realización de una queratoplastia penetrante<sup>25, 26</sup>. El término queratocono se refiere a la forma cónica que adopta la córnea<sup>22, 23</sup>. La estabilidad

mecánica de la córnea se encuentra disminuida (dada la alteración en la estructura) y esto juega un importante papel en la protrusión corneal, lo que conlleva un daño en la agudeza visual iniciando un astigmatismo, miopía progresiva, adelgazamiento corneal y cicatrices corneales centrales<sup>22, 23</sup>.

Históricamente, se definía esta patología como una alteración producida en el epitelio corneal, pero gracias a los estudios ultraestructurales (microscopía electrónica) y microscopía confocal se ha demostrado que los cambios se producen a todos los niveles de la córnea<sup>27, 28</sup>. En esta patología, las fibras de colágeno se encuentran alteradas y su entrecruzamiento está disminuido<sup>29</sup>; todo esto conlleva una flacidez estructural que se ve potenciada por las roturas en la membrana de Bowman<sup>30, 31</sup>. Esta membrana, cuya funcionalidad sigue siendo hoy en día discutida<sup>32</sup>, es importante para mantener la estabilidad de la curvatura corneal<sup>33, 34</sup>. Las roturas que se producen permiten la invasión de queratocitos procedentes del estroma corneal anterior y de células epiteliales<sup>30</sup>. Estos queratocitos sufren un proceso de apoptosis que conlleva una liberación de enzimas colagenolíticas<sup>21</sup>. La invasión de los queratocitos continuada en el tiempo tiene como consecuencia una pérdida más acentuada en el estroma anterior, provocando un adelgazamiento localizado y progresivo y un incremento de la toricidad corneal<sup>21</sup>.

Para detallar la organización del colágeno en las zonas apicales y para-apicales del queratocono comparadas con córneas normales, Radner *et al* diseñaron un estudio basado en microscopía electrónica<sup>35</sup>. En dicho estudio, mientras que la organización de las lamelas de colágeno en la zona para-apical es similar, tanto en córneas queratocónicas como en sanas, sí se puede observar una alteración considerable en la organización del colágeno de las córneas queratocónicas<sup>35</sup>. Dicha alteración consiste en límites no definidos entre lamelas, las fibrillas de colágeno pierden su orientación paralela y hay cambios de dirección a lo largo de su longitud<sup>35</sup>. Las uniones entre capas adyacentes disminuyen o desaparecen e incluso se presentan fibrillas desordenadas que pueden llevar a cicatrices estromales<sup>35</sup>.

Erie *et al* y Kenney *et al* confirmaron lo anteriormente descrito mediante estudios de microscopía confocal *in vivo* en especie humana, comparando córneas sanas con córneas queratocónicas, detectando en estas últimas una densidad disminuida del estroma anterior y por tanto un adelgazamiento del estroma corneal total<sup>36, 37</sup>. De igual forma la microscopía confocal *in vivo*, apoyada por la microscopía *in vitro*, son tecnologías útiles para la comparación de los cambios en la morfología queratocónica confirmando cambios en las células superficiales de longitud y aplanamiento, adelgazamiento del estroma corneal en la región central de la misma y presencia de neblina e hiperreflectividad, así como desorganización de las fibras de colágeno en áreas de cicatrización<sup>36, 38, 39</sup>. La microscopía confocal *in vivo* se ha establecido como un método viable para la investigación de la morfología corneal, con el suficiente potencial para monitorizar los cambios celulares en esta patología evidenciando elongamiento en las células superficiales epiteliales hacia el ápex de la córnea, cambios en la capa de células basales y formación de estrías de Vogt en el estroma<sup>40</sup>.

Hollingsworth *et al*, en el año 2005, realizan un estudio similar en el que evalúan la morfología de 51 córneas queratocónicas de la especie humana por medio de la utilización de microscopía óptica y confocal<sup>27</sup>. En este trabajo se obtienen imágenes de las células epiteliales de 10 córneas mediante microscopía confocal, de las cuales 6 presentan las células irregulares elongadas y con forma de “huso” que describe por primera vez Tsubota *et al*<sup>41</sup>, así como los autores anteriormente indicados<sup>36, 38-40</sup>. Otros resultados más relevantes que se extraen de este estudio es la apariencia anormal de la membrana de Bowman, con presencia de núcleos de células epiteliales y de queratocitos, así como un adelgazamiento<sup>27</sup>, confirmando lo descrito por Sawaguchi *et al* en el año 1998, en un 57% de las muestras obtenidas<sup>42</sup>. Las imágenes obtenidas por microscopía óptica sugieren que estos cambios pueden deberse a la cercanía de la cicatriz apical<sup>27</sup>. La neblina y la presencia de hiperreflectividad del estroma que relatan Erie *et al*<sup>36</sup> y Kenney *et al*<sup>37</sup> en sus estudios, también se describen en este trabajo<sup>27</sup>. Por último, el análisis de

la membrana de Descemet y del endotelio corneal no presenta anormalidades<sup>27</sup>. Los autores señalan que puede deberse al hecho de que las imágenes son tomadas de la córnea central, que no suele ser típicamente el centro del cono<sup>27</sup>.

Para intentar comprender los cambios en la distribución de las fibras de colágeno en las córneas queratocónicas frente a una córnea sana en la especie humana, Meek *et al*, en el año 2005, refieren un estudio utilizando rayos X de dispersión<sup>43</sup>. Este sistema puede determinar cuantitativamente la orientación de las fibras de colágeno mediante reflexión (ecuatorial) de los ángulos de las fibras de colágeno<sup>43</sup>. En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se considera que dichos cambios en la orientación se promueven por una pérdida en las fuerzas cohesivas de las fibras de colágeno y en un fallo mecánico en las regiones donde las laminillas que conforman las fibras se bifurcan<sup>43</sup>.

La sintomatología depende del grado de desarrollo del queratocono, la principal consecuencia es la inducción de astigmatismo y miopía<sup>22</sup>. Suele aparecer en la pubertad y su tasa de progresión es muy variable y poco predecible<sup>22</sup>. En las primeras fases de la patología la visión no está necesariamente afectada, sin embargo en estadios finales el paciente detecta imágenes distorsionadas con halos, diplopías, deslumbramientos y función visual comprometida<sup>22</sup>.

El paciente sufre un incremento del defecto dióptrico y astigmático por lo que la imagen enfocada se forma delante de la retina en vez de focalizarse sobre ella, causa por la cual la imagen que percibe el paciente con queratocono está desenfocada<sup>22</sup>.

La comprensión de la patofisiología del queratocono podría aportar una mejor comprensión del mecanismo de la ectasia postquirúrgica, pero actualmente se desconocen los mecanismos de producción de la córnea queratocónica y sus posibles causas<sup>22</sup>. En la bibliografía consultada se describen multitud de factores predisponentes: genéticos<sup>44</sup>, bioquímicos (secreción de metaloproteinasas y

otras enzimas líticas por parte de la matriz)<sup>45</sup>, biomecánicos (frotamiento de ojos)<sup>46</sup>, hormonales<sup>47</sup>, etc., pero no se describe un mecanismo de producción determinado<sup>22, 23, 29</sup>.

## Ectasia postquirúrgica

La retirada de tejido corneal y la pérdida de la integridad de la membrana de Bowman durante la cirugía refractiva conlleva un incremento en el riesgo de una protrusión de la córnea anterior, comportándose de manera similar al queratocono<sup>24, 48, 49</sup>. En los años 90 se populariza la cirugía refractiva con láser excimer, con unos resultados espectaculares que llevan a operar con esta técnica de manera masiva sin haber realizado estudios a largo plazo que evalúen posibles complicaciones<sup>50</sup>. Desde que Seiler *et al* publican en 1998 el primer caso de queratectasia iatrogénica<sup>51</sup>, el número de trabajos al respecto ha crecido de forma exponencial, saliendo a la luz más casos de ectasias corneales inducidas tras la cirugía y otra serie de complicaciones<sup>52-55</sup>. Actualmente, se estima que la incidencia aproximada de las ectasias corneales post-LASIK es de 1/2500 casos<sup>56</sup>. Hay que añadir que la prevalencia-incidencia de esta alteración corneal se desconoce exactamente y que probablemente esté por encima de lo publicado, dado que no todos los casos se reportan tal vez por pudor por parte de los cirujanos. En el congreso de la Sociedad Europea de Catarata y Cirugía Refractiva (ESCRS-2006) se tuvo en cuenta la necesidad de crear un registro europeo donde los oftalmólogos pudieran comunicar de manera anónima los casos de ectasia post-LASIK para poder tener una estadística más fiable<sup>57</sup>. La fase de evaluación de este proyecto se inició en el 2008 y se puso en marcha a partir del 2010. Gracias a este registro los cirujanos pueden supervisar y comparar los resultados quirúrgicos obtenidos, lo que conlleva mejorar la seguridad y la estrategia a plantear en la cirugía<sup>57, 58</sup>.

En este caso, se considera prioritario evaluar las modificaciones cuantitativas y morfológicas de la córnea<sup>59, 60</sup>. En resumen, los estudios en este senti-

do se centran en determinar el efecto de la cirugía refractiva (láser excimer, Queratectomía fotorefractiva, etc.) en la geometría de la córnea<sup>59, 60</sup>. Los topógrafos con sistema de escáner de hendidura y los paquímetros son un apoyo indispensable para valorar la evolución de la morfología anterior y posterior de la córnea así como el espesor corneal, después de este tipo de cirugías refractivas<sup>22, 61, 62</sup>.

En ausencia de una prueba específica para detectar el riesgo de ectasia, un grupo de expertos en cirugía refractiva reunido en el congreso de la Academia Americana de Oftalmología (AAO) del año 2005, establecieron una serie de factores de riesgo para el desarrollo de la ectasia corneal<sup>49</sup>:

- Presencia de nervios corneales prominentes.
- Anillo de Fleischer.
- Patrón topográfico (incluye forma frustre).
- Historia familiar de queratocono.
- Presencia de queratocono en un ojo.
- Córnea delgada asimétrica.
- Astigmatismo asimétrico.
- Astigmatismo irregular.
- Estrías de Vogt.
- Adelgazamiento corneal.
- Cicatrización apical de la córnea.
- Irregularidad corneal que no puede corregirse con gafas.

Así como una serie de factores de riesgo para el desarrollo de la ectasia corneal post-quirúrgica<sup>49</sup>:

- Alta miopía.
- Reducido espesor corneal preoperatorio.
- Lecho estromal reducido tras ablación láser.
- Queratocono frustre preoperatorio.

Estos son factores que hay que tener en cuenta a la hora de decantarse por la cirugía con láser excimer<sup>49</sup>. No obstante, a pesar de haberse establecido posibles factores de riesgo, en la bibliografía se han hallado referencias de estudios de ectasia post-

LASIK en pacientes intervenidos que no tenían aparentemente factores de riesgo asociados<sup>63, 64</sup>, como es el caso del trabajo realizado por Klein *et al* en 25 pacientes con ectasia post-LASIK<sup>63</sup>. En él refieren 3 causas posibles de la ectasia que se produce después de la aplicación de la técnica: un inadecuado lecho estromal (error en la toma de medida previa o por un incorrecto ensamblaje del microqueratomo a la hora de realizar el flap corneal), presencia de anomalías no detectadas en topografía preoperatoria o una inestabilidad biomecánica de la córnea con anomalías no detectables por la tecnología actual<sup>63</sup>.

Hay numerosos estudios o informes de casos de ectasia corneal después del uso del LASIK para tratamiento de miopía sin una definición consistente de la patología ni una etiología definitiva<sup>56, 63, 65-67</sup>. Concretamente Twa *et al*, en el año 2004, publican un estudio retrospectivo de los casos reportados en la especie humana, hasta esa fecha, en el que describen las características comunes de este hallazgo postoperatorio comparándolo con pacientes tratados con LASIK con resultados exitosos<sup>65</sup>. En dicho estudio, establecen una serie de características de las ectasias post-LASIK entre las que destacan una agudeza visual corregida de 20/25 o menor, astigmatismo de 1.25 dioptrías (D) o mayor, grosor corneal menor de 400  $\mu\text{m}$  o una profundidad de ablación de al menos 76  $\mu\text{m}$ <sup>65</sup>. Todos estos valores predictivos pueden utilizarse para la detección temprana de ectasia post-LASIK e instauración de un tratamiento temprano<sup>65</sup>.

También en el 2004, Kamiya *et al*, publican los resultados de un estudio realizado en pacientes miopes de 65 ojos que han sido tratados con queratectomía fotorefractiva (PRK) y 45 ojos a los que se les ha aplicado la técnica de "Laser in situ Keratomileusis" (LASIK)<sup>68</sup>. Utilizaron como variables de estudio el tiempo que tarda la córnea en volver a protruirse (tiempos de seguimiento: 1 semana, 1, 3, 6 y 12 meses), la comparación entre la elevación anterior y posterior de la córnea, el grosor corneal, la corrección de la miopía conseguida y su relación con la regresión de la miopía que se obtiene una vez realizados los tratamientos<sup>68</sup>. Ambas técnicas inducen una protrusión de la córnea<sup>68</sup>. A la sema-

na y al mes de la aplicación de los tratamientos, el LASIK induce mayor protrusión que la que se produce con la PRK, incluso en similar miopía<sup>68</sup>. Según Kamiya *et al*, esto puede deberse a que en la cirugía LASIK se produce una ablación más profunda en el estroma corneal<sup>68</sup>, hipótesis que se apoya en los resultados de Park *et al* en los que se demuestra que el estroma anterior es el debilitado por la creación del flap corneal y la ablación del tejido durante la cirugía de LASIK favoreciendo la protrusión<sup>69</sup>. Sin embargo mientras que esta protrusión se estabiliza después de una semana, la producida por la PRK progresa de forma gradual hasta los 6 meses posteriores, resultados de los que se desconoce el mecanismo subyacente en la actualidad y sobre los que se debe seguir trabajando<sup>68</sup>. No obstante, a diferencia de otros autores, este grupo no considera esta protrusión una verdadera ectasia por no cumplir las condiciones de estiramiento de las fibras de colágeno<sup>68</sup>.

## TÉCNICAS DE MODELADO CORNEAL

### *Ortoqueratología (Orthokeratology) (Ortho-K)*

En 1971, la International Orthokeratology Section de la National Eye Research Foundation de los Estados Unidos definió el tratamiento ortoqueratológico como la "reducción, modificación o eliminación de las anomalías refractivas mediante la aplicación programada de lentes de contacto"<sup>70</sup>. En la última década, son amplias las investigaciones de interés clínico y científico en este campo<sup>70</sup>. Actualmente se obtienen buenos resultados aplicando una sola lente en lugar de una sucesión de ellas cada vez más planas durante un periodo de semanas o meses<sup>70</sup>. Este tratamiento está indicado cuando no lo está la cirugía refractiva o cuando el paciente descarta dicho tratamiento quirúrgico<sup>70</sup>.

Este método modelador de la córnea consiste en la adaptación de unas lentes de contacto gas permeable rígidas (permiten la oxigenación de

la córnea) que moldean la forma de la córnea, al cambiar la curvatura reduciendo la cantidad de dioptrías y produciendo un aplanamiento que compensa la miopía<sup>71</sup>. A diferencia de las lentes convencionales, estas lentes de contacto están diseñadas para aplanar la córnea de forma controlada<sup>70</sup>. Su comportamiento en la función visual es idéntico a las convencionales ya que el paciente puede ver con claridad<sup>70</sup>. Las lentes ortoqueratológicas inducen una reducción transitoria del error refractivo aprovechando la plasticidad de la córnea, concretamente de su epitelio<sup>71</sup>. Después de su retirada, la modificación de la córnea se mantiene durante cierto tiempo, al principio la duración es de unas horas pero posteriormente se estabiliza llegando a mantener la modificación producida durante todo el día<sup>72</sup>. Como se ha comentado anteriormente, este tratamiento es de efecto reversible, de tal forma que si el paciente deja de utilizar este tipo de lentes, se vuelve a instaurar el estado refractivo previo al tratamiento<sup>72</sup>.

Hoy en día, la modalidad nocturna es la más utilizada, la córnea se remodela durante el sueño y al despertar se retiran las lentes<sup>70</sup>. Los cambios suelen ser muy rápidos hasta incluso alcanzar un resultado excelente en un plazo de entre una y dos semanas<sup>73</sup>. Esta modalidad nocturna prevalece entre las demás dado que por un lado se elimina la acción de factores ambientales que sí condicionarían el tratamiento diurno como son el viento, polvo, etc.; y, por otro lado, la presión de los párpados cerrados acelera el remodelado corneal<sup>70</sup>.

En la actualidad, las lentes de contacto de geometría inversa (curvatura invertida) están diseñadas para generar una fuerza hidrodinámica sobre la córnea con la que se pretende inducir la migración de las células epiteliales y lograr así un cambio en las primeras capas celulares<sup>71, 74</sup>. Para que esta fuerza resulte eficaz, la adaptación debe reunir unas características en cuanto a posición (el centrado de la lente es decisivo), movimiento (deben moverse menos que las lentes convencionales, debe poseer un desplazamiento inducido por el parpadeo de 0,2 y 1,0 mm) y espacio entre lente y córnea (la transición entre las distintas zonas debe ser progresiva y no demasiado amplia)<sup>70</sup>.

Este tipo de tratamiento puede utilizarse en la miopía baja y moderada, hasta 6,00 D, incluso asociada a un astigmatismo bajo<sup>70</sup>. En las miopías más altas este tratamiento es capaz de reducir el defecto de refracción pero no lo corrige totalmente<sup>70</sup>. En la mayoría de los casos, una excesiva toricidad corneal o un astigmatismo superior al componente esférico del defecto de refracción se consideran contraindicaciones para el tratamiento ortoqueratológico<sup>70</sup>.

El futuro más prometedor de esta técnica modeladora va orientado al tratamiento de la hipermetropía y la presbicia mediante el aumento de la curvatura corneal<sup>70</sup>.

## Contraindicaciones

Las contraindicaciones de la ortoqueratología son las siguientes<sup>70</sup>:

- Trastornos oculares que no permitan la adaptación de lentes de contacto (inflamaciones del segmento anterior).
- Cualquier enfermedad, lesión o anomalía ocular que afecte a la córnea, la conjuntiva o los párpados.
- Cualquier enfermedad sistémica que pueda afectarse por el contacto de las lentes (afecciones del sistema inmunitario).
- Reacciones alérgicas de la superficie o de los anejos oculares.
- Alteraciones importantes de la producción de la lágrima.

## *Termoqueratoplastia (TKP)*

En 1900, Terrien describió por primera vez el uso de un cauterio para corregir un defecto refractivo<sup>75</sup>. En el caso del queratocono, hubo que esperar hasta bien avanzado el siglo XX, concretamente en el año 1964, para que se registrara en la bibliografía la primera aplicación de sondas calentadas para aplanar córneas queratocónicas

siendo numerosas las publicaciones posteriores en este sentido<sup>76</sup>. Estos estudios no fueron tan exitosos como se esperaban obteniendo resultados poco predecibles<sup>76</sup>.

Ya en el año 1973 Gasset *et al* desarrollan un instrumento, el Termoqueratóforo<sup>77</sup>. Este sistema consiste en una sonda de plata en cuya punta se incluye una resistencia térmica<sup>77</sup>. Este nuevo instrumento fue probado en tiras de córnea porcina para su puesta a punto hasta que lo aplicaron en 15 ojos con queratocono con la punta calentada desde 90° hasta 150° con diferentes tiempos de aplicación, obteniendo los mejores resultados con las temperaturas más altas<sup>77</sup>. En 1981 Itoi refiere una serie de 750 casos de queratocono tratados con queratoplastia térmica en la que sólo el 7% necesitaron un trasplante de córnea<sup>78</sup>. Los siguientes ensayos realizados iban encaminados a mejorar la tecnología necesaria para la aplicación de este tratamiento consiguiendo en los años 80 ampliar su utilización en el tratamiento de la hipermetropía y el astigmatismo<sup>79, 80</sup>. En 1990, Neumann *et al* describen la queratoplastia térmica radial consistente en la aplicación de una sonda de termoqueratoplastia de forma radial en la periferia media, determinando que para conseguir el efecto esperado se dependía de factores tales como el respeto de la zona óptica central, del número de radios realizados y del número de aplicaciones por cada radio<sup>80</sup>. Estos autores obtuvieron una buena estabilidad del estado refractivo de las córneas durante el primer año<sup>80</sup>. Pasado este tiempo los autores relataron una serie de complicaciones tales como erosiones corneales, pliegues corneales, astigmatismos reducidos, neovasos periféricos y pannus corneal<sup>80</sup>.

Un avance primordial en este campo fue la utilización de fuentes de láser para liberar cantidades de energía térmica regulada<sup>81</sup>. En 1979, Mainster *et al* describen un modelo teórico para la utilización de láseres en la queratoplastia térmica resaltando la importancia de estos sistemas para liberar calor de forma más controlada y por tanto con menos daño para el endotelio y el epitelio<sup>82</sup>. Se han establecido diferentes métodos para la realización de la termoqueratoplastia tales como láser de CO<sub>2</sub> o

láser de diodo<sup>81</sup>. La queratoplastia térmica basada en láser, aunque destacando en sus inicios, tiene unas grandes limitaciones dado los grandes índices de regresión que presenta<sup>83</sup>. Por otro lado, el uso de la técnica basada en láser de diodo consigue inducir mayores cambios a mayor tiempo de irradiación y a menor zona óptica<sup>84, 85</sup>. Como principal ventaja tiene la capacidad de calentar de forma más uniforme el colágeno corneal<sup>84, 85</sup>.

### *Queratoplastia Conductiva (CK)*

La queratoplastia conductiva es una técnica modeladora de la córnea que emplea la radiofrecuencia para modificar las fibras de colágeno de la córnea<sup>86</sup>. El objetivo es producir en el estroma corneal un aumento de temperatura suficiente para producir la contracción de las fibras del colágeno y por tanto una modificación de la curvatura corneal y del poder refractivo<sup>86</sup>. El despegue de la CK se produce entre los años 2003 y 2006 como alternativa para la hipermetropía, presbicia y determinados astigmatismos<sup>86</sup>. En el año 1997, Méndez *et al* describen por primera vez un sistema en el que a través de la aplicación de la radiofrecuencia en la periferia corneal (y sin sustracción de tejido) se consigue aumentar su curvatura<sup>87</sup>. En este estudio, los autores penetran en el interior de la córnea con unos aplicadores metálicos siguiendo un patrón circular de 8 a 32 aplicaciones en la periferia corneal, de esta forma los puntos de aplicación actúan como un cinturón curvando la córnea central y como consecuencia disminuyendo el número de dioptrías<sup>87</sup>.

La técnica quirúrgica consiste en marcar la córnea con un marcador mojado en violeta de genciana o azul de metileno centrado respecto al eje de la mirada<sup>86</sup>. Posteriormente se aplica la punta del equipo de termoqueratoplastia de forma perpendicular en las zonas marcadas<sup>86</sup>. Una variedad de la técnica consiste en utilizar un anillo de succión conectado a una jeringuilla con resorte que es la que produce el vacío<sup>86</sup>. Una vez se comprueba la correcta succión y la estabilidad producida se tracciona el globo ocular hacia arriba mientras se marcan dos o tres puntos a través de

los radios libres del anillo, posteriormente la punta del equipo se introduce por los orificios del anillo de succión diseñados para tal fin<sup>86</sup>.

## Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión absolutos son<sup>86</sup>:

- Pacientes con agudez visual corregida inferior a 0.5.
- Paquimetrías a 6mm del ápex corneal inferiores a 560  $\mu\text{m}$ .
- Pacientes que presentan algún tipo de tropia o foria.
- Patología activa del polo anterior.
- Patología palpebral que imposibilite la colocación del blefarostato o que altere el parpadeo normal.

En el mismo sentido se establecen unos criterios de exclusión relativos<sup>86</sup>:

- Erosiones corneales recurrentes.
- Historia de queratitis por herpes.
- Glaucoma.
- Historia de aumento excesivo de la PIO por esteroides.
- Procesos autoinmunes.
- Diabetes.
- Queratitis seca intratable.

## Segmentos intracorneales

Han sido muchos los estudios sobre cuál sería el material idóneo para este tipo de implantes<sup>88</sup>. En 1964, Belau *et al* concluyen que los implantes de silicona y de polimetilmetacrilato (PMMA) se toleraban bien al insertarlos en la córnea de perros<sup>88</sup>.

A finales de la década de los 80 se publican las primeras experiencias de Fleming *et al* con anillos de plástico en dos animales de la especie cunícula,

que denominan *intrastromal corneal ring* (ICR)<sup>89</sup>. Se trata de implantes anulares de PMMA con una abertura que se cerraba mediante una grapa metálica de tal forma que se puede obtener un efecto expansivo o constrictor según se fijase dicha grapa<sup>89</sup>. En los resultados histológicos se detecta una activación de los queratocitos, formación de nuevo colágeno y depósitos lipídicos alrededor de los implantes<sup>89</sup>. Se desarrolla un modelo matemático para predecir el efecto refractivo según la relación de los radios corneales con los del anillo<sup>89</sup>. No obstante, este tipo de anillos sólo se llega a emplear en la corrección de miopías, y esta idea inicial del cierre variable con grapas se desecha<sup>89</sup>.

El ICR evoluciona a dos segmentos anulares de 150° de arco y diámetros internos y externos respectivamente de 6,77 y 8,10 mm, pasando a llamarse *intrastromal corneal rings segments* (ICRS), una configuración conocida a partir de 1999 bajo la marca Intacs®<sup>90</sup>. En 1995 se inicia un primer estudio clínico en ojos de miopía leve a moderada en la especie humana, produciendo un cambio refractivo y con una buena predictibilidad en miopías leves<sup>91</sup>. En tres casos se produce deslumbramiento e imágenes dobles en visión nocturna<sup>91</sup>. Estos anillos se explantan y hay un retorno de la refracción preoperatoria dentro de un margen de 1,00 D con lo que se comprueba la reversibilidad del procedimiento<sup>91</sup>. Este hallazgo se reafirma gracias a Alió *et al*, que en el año 2006, publican un estudio retrospectivo de 13 ojos a los que se les implanta Intacs® para la corrección del queratocono y en el que se detecta en el seguimiento una progresión en los valores de la curvatura corneal (valores K), demostrando de esta forma que los anillos pueden corregir errores refractivos de forma temporal y por tanto no proporcionan un efecto de aplanamiento permanente<sup>92</sup>.

Este procedimiento posee resultados temporales dado que la corrección del error refractivo desaparece cuando se retiran los anillos<sup>93, 94</sup>.

Pese a los buenos resultados y la ventaja de preservar la asfericidad corneal, aparte de su economía, los ICRS nunca llegan a suponer más

que una porción muy minoritaria en el campo de la corrección de la miopía, de esta forma pasaron a emplearse en los defectos residuales tras cirugía tipo LASIK o tras queratoplastia penetrante, especialmente en queratocono, así como en otras ectasias corneales<sup>90</sup>.

De forma paralela a la creación de este tipo de segmentos, Paulo Ferrara desarrolla a partir de 1986 unos estudios de implantes anulares de PMMA de sección triangular mediante bolsillo corneal en la especie canina<sup>90</sup>. Las primeras publicaciones indexadas al respecto de estos “anillos de Ferrara” aparecen en el 2002, presentando resultados prometedores en el tratamiento del queratocono, en particular, en pacientes que son intolerantes a las lentes de contacto<sup>95, 96</sup>.

La implantación de los anillos intracorneales no es una técnica exenta de complicaciones<sup>90</sup>. Se puede presentar una neovascularización de la incisión de entrada de los segmentos, la migración de estos por el estroma corneal o una extrusión si la córnea es excesivamente delgada<sup>90</sup>. De igual forma en la bibliografía se registran varios casos de infecciones corneales posteriores a la implantación de los anillos, con disminución de la visión, inflamación e infiltrados estromales localizados en los extremos de los anillos<sup>97-99</sup>.

Debido a la gran variabilidad de anillos clasificados en función del espesor, tamaño, longitud de arcos variable (Intacs®, anillos de Ferrara, anillos intracorneales Keraring-Ferrara, etc.), antes de elegir el anillo ideal hay que examinar con detenimiento las condiciones de la córnea que se va a tratar; evaluar su espesor y su grado de ectasia antes de elegir el anillo ideal<sup>90</sup>.

### *Queratectomía refractiva (photorefractive keratectomy) (PRK) / (LASIK)*

Con el uso del láser excimer (haz de luz ultravioleta frío) se eliminan diminutos trozos de la superficie corneal (ablación corneal) con el fin

de remodelarla<sup>100</sup>. Está indicada en pacientes con miopía y astigmatismo y sospecha de queratocono ya que mejora la visión y la tolerancia a las lentes de contacto<sup>100-102</sup>.

La técnica LASIK se realiza de igual forma pero exige que la córnea tenga un espesor mayor para la realización de un flap corneal<sup>49</sup>. Previamente a la cirugía se levanta una capa fina de tejido corneal que luego se sitúa encima sin necesidad de puntos de sutura<sup>49</sup>. Actualmente, el queratocono supone una contraindicación absoluta para el tratamiento de los defectos de refracción mediante esta técnica, por la importante disminución del espesor corneal que produce en la ya debilitada estructura corneal de este trastorno<sup>49</sup>. La necesidad de realizar una queratoplastia posterior en muchos casos ha hecho que muchos autores ya no tengan en cuenta este procedimiento como de elección primaria<sup>24, 49</sup>.

## TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE LA CÓRNEA ECTÁSICA

Los trasplantes de córnea, además de ser cirugías con mayor riesgo que las anteriormente descritas, tienen un agravante al tratarse de la utilización de un tejido donante con los riesgos de rechazo que eso supone, rechazo que ocurre en menor medida en el trasplante de espesor parcial<sup>103, 104</sup>.

### *Queratoplastia lamelar (lamellar keratoplasty) (LKP)*

Consiste en la realización de un trasplante de córnea de espesor parcial<sup>105</sup>. Se procede a la resección del estroma patológico del receptor dejando la membrana de Descemet y el endotelio intactos<sup>105</sup>.

La mayor complicación de la técnica reside en la disección lamelar del estroma sin perforar la membrana de Descemet<sup>105</sup>. Se describen varias técnicas para facilitar esta maniobra como la inyección de aire<sup>105</sup> o de solución salina<sup>106</sup>.

Las indicaciones clínicas de esta técnica incluyen el queratocono, anomalías inducidas quirúrgicamente por queratotomía refractiva, degeneraciones del estroma corneal, etc.<sup>105</sup>.

### *Queratoplastia penetrante (penetrating keratoplasty) (PKP)*

Consiste en realizar un trasplante de córnea de espesor total<sup>105</sup>. Presenta peor periodo postoperatorio en cuanto a recuperación del paciente que la LKP, mayor riesgo de rechazo del injerto y tiene el riesgo de una cirugía intraocular<sup>105</sup>. Sin embargo ofrece mejores resultados visuales que la LPK en el tratamiento del queratocono<sup>107-110</sup>.

En una revisión bibliográfica exhaustiva en el año 1990 sobre las causas de rechazo del injerto en este tipo de técnica, Wilson *et al*, publican un amplio trabajo sobre las mismas, señalando como responsables: factores del tejido donante o de su conservación, complicaciones de la técnica quirúrgica (ej. sinequias anteriores, inadecuado uso de los agentes viscoelásticos, etc.), defectos epiteliales persistentes (ej. producidos por queratitis herpéticas, quemaduras por álcali, síndrome de Stevens-Johnson, etc.), rechazo inmunológico por parte del receptor (causa más común de fallo del injerto), infección del injerto (ej. queratitis herpéticas, bacterianas o fúngicas, etc.), glaucoma, trauma y distrofias corneales primarias (ej. Distrofia de Fuchs)<sup>103</sup>.

Esta técnica tiene un amplio abanico de indicaciones como ya señalan Killingsworth *et al*, en el año 1993, donde refieren un estudio retrospectivo de pacientes a los que se les realizó una queratoplastia penetrante 9 años antes<sup>104</sup>. Las patologías presentes en las córneas que fueron incluidas para la queratoplastia penetrante fueron: queratitis bacterianas y fúngicas, queratitis herpéticas (con y sin inflamación), queratitis por *acanthamoeba*, perforaciones debidas a queratoconjuntivitis seca y otras causas de perforación<sup>104</sup>. El 73% de los injertos corneales en el caso de las queratitis bacteriana mantiene la transparencia mientras que en

las fúngicas se obtiene un 60% de éxito<sup>104</sup>. En las queratitis herpéticas se alcanza un 36% de éxito pero manifiesta posteriormente inflamación<sup>104</sup>. El resultado más destacable de este trabajo es que obteniéndose un 83% de estabilización anatómica en los casos de queratoconjuntivitis seca, todos los injertos fallan por complicaciones de la enfermedad de la superficie ocular, no por fallos de la técnica<sup>104</sup>.

### *Segmentos intracorneales*

Una vez demostrada la seguridad y eficacia de la colocación de segmentos intracorneales en el tratamiento de la miopía leve y moderada y recientemente, también en el manejo del queratocono, se plantea la posibilidad de utilizarlos para queratoplastia refractiva<sup>54,111</sup>. Concretamente Colin *et al*, en el año 2001, fueron los primeros autores en publicar resultados con la utilización de anillos corneales intraestromales en queratocono (Intacs®)<sup>111</sup>. Este estudio demuestra una reducción del astigmatismo producido por el queratocono además de una regularidad topográfica<sup>111</sup>.

Resultados similares en la mejoría de la agudeza visual, el aplanamiento topográfico y el corto periodo de rehabilitación, obtienen Kanellopoulos *et al*, en su trabajo diseñado en el 2006 sobre 20 ojos de 15 pacientes con queratocono de grado moderado a avanzado, excepto por un grupo significativo de 6 ojos en los que se registran problemas postoperatorios (35 %) relacionados con mayor adelgazamiento de la córnea (debido al grosor irregular de las córneas queratocónicas) y, por tanto, la exposición de los anillos<sup>112</sup>.

Posteriormente, en el año 2007, de nuevo el grupo de Colin *et al*, presentan un estudio preliminar que incluye 100 ojos queratocónicos con la córnea clara central e intolerancia a las lentes de contacto para corregir el astigmatismo con segmentos de arco más corto<sup>113</sup>. Los resultados sitúan a los anillos corneales (Intacs®) como un tratamiento seguro y eficaz para el queratocono dado que se consiguen mejoras significantes en los resultados visuales en la mayoría de los casos, así

como la restauración de la tolerancia a las lentes de contacto<sup>113</sup>. Al igual que Rabinowitz y Shetty *et al*, en estudios posteriores, refieren estos anillos corneales como un método potencialmente ajustable y reversible<sup>52, 114</sup>.

Actualmente en la bibliografía, a falta de estudios a largo plazo, se registra su utilización para queratectasias post-LASIK<sup>53, 115</sup>. Siganos *et al*, en el año 2002, implantan en 3 ojos de la especie humana con ectasia post-LASIK los anillos corneales (Intacs®) obteniendo buenos resultados refractivos con mejora de la agudeza visual y sin complicaciones<sup>55</sup>. Estos resultados se revalidan un año después por este mismo grupo de trabajo con Kymionis a la cabeza en un estudio con mayor número de casos<sup>53</sup>. En este último, a pesar de la mejora de la agudeza visual y de resultados esperanzadores después de un año de seguimiento, se ratifica la falta de estudios a largo plazo de este procedimiento para aseverar su eficacia en las ectasias post-LASIK de forma segura, coincidiendo de esta forma con otros autores<sup>53</sup>.

### *Asociación de técnicas*

El uso de la combinación de dos o más técnicas quirúrgicas busca reducir los riesgos de traspasar las limitaciones de cada uno aplicada de forma individual, y ampliar la gama de correcciones que se pueden ofrecer al paciente de una forma segura<sup>116</sup>. En lo que se refiere a la técnica quirúrgica, las posibles complicaciones y efectos secundarios de la tunelización para la introducción de los segmentos intracorneales son<sup>116</sup>:

- perforaciones.
- defectos epiteliales.
- tunelización superficial con migración tardía del segmento.
- extrusión.

Estos han mejorado notablemente con los nuevos avances tecnológicos señalando concretamente la aparición del láser femtosegundo en el 2004, el cual ha aportado seguridad y eficacia, mejorando

los parámetros visuales del paciente<sup>117, 118</sup>.

Se destacan a continuación las combinaciones de técnicas más frecuentes<sup>116</sup>:

### Anillos intracorneales + tratamiento ortoqueratológico nocturno

Esta combinación parte de la utilidad para remodelar de forma transitoria la superficie anterior de la córnea gracias a la aplicación de lentes de contacto rígidas permeables a gas (LC-RPG)<sup>71, 119</sup> y a la alta sensibilidad de la córnea queratocónica al remodelado para mejorar los índices de regularidad de la superficie y el rendimiento visual<sup>120</sup>. Por motivos que hoy en día se desconocen, el efecto de remodelado corneal que produce una lente de contacto RPG es más duradero en ojos en los que ya se han implantado segmentos anulares intraestromales (Intacs®) que en ojos queratocónicos sin ningún procedimiento previo<sup>116</sup>.

Mediante la asociación de estas técnicas, Calossi *et al* proponen el uso de la ortoqueratología para reducir la aberración corneal en queratoconos progresivos y aplicación del tratamiento crosslinking para estabilizar el efecto moldeador conseguido por la ortoqueratología<sup>121</sup>. En su trabajo determinan que la ortoqueratología mejora la forma corneal temporalmente pero que la aplicación del tratamiento crosslinking no consigue estabilizar dicho cambio en la forma corneal incluso un mes después de interrumpir la aplicación de la ortoqueratología<sup>121</sup>. No obstante, mejora la agudeza visual corregida manteniendo una mejora un año después de la aplicación de la combinación de técnicas<sup>121</sup>.

### Anillos intracorneales después de una queratoplastia lamelar o penetrante

En pacientes que se han sometido a una queratoplastia lamelar o penetrante, cuando no se puede tratar un astigmatismo postoperatorio alto

o irregular mediante lentes de contacto RPG y este error refractivo está disminuyendo la calidad de vida del paciente, no es factible implantar los Intacs® debido al diámetro de estos segmentos ya que quedarían demasiado cerca de la unión injerto-huésped<sup>116</sup>. En este campo se considera más seguro implantar segmentos Ferrara Ring o Keraring dado su distinto diámetro<sup>122</sup>.

## Anillos intracorneales + tratamiento crosslinking

La fotopolimerización producida por la combinación de riboflavina y luz ultravioleta A, aumenta la rigidez biomecánica del estroma y estabiliza los trastornos ectásicos de la córnea induciendo de esta forma una mejoría en la irregularidad de la superficie corneal y en la agudeza visual<sup>123-126</sup>.

La combinación de este tratamiento con la implantación de Intacs® permite potenciar el efecto de aplanamiento de estos últimos<sup>116</sup>. Chan *et al*, realizan un estudio, en el año 2007, en 25 ojos de la especie humana en los que se implantan Intacs® y posteriormente aplican la riboflavina y la luz ultravioleta<sup>127</sup>. En los resultados se observa una reducción estadísticamente mayor del cilindro y de los valores de K en el grupo tratado con Intacs® más crosslinking que en el grupo sólo tratado con Intacs®<sup>127</sup>.

En este sentido, Vicente *et al*, refieren un estudio retrospectivo de 14 ojos a los que se les realiza el tratamiento crosslinking transepitelial (sin necesidad de retirar el epitelio corneal y con la aplicación de la riboflavina-carboximetilcelulosa) seguida de la aplicación de Intacs®<sup>128</sup>. Los valores de la queratometría se reducen, los parámetros visuales son estables y la córnea incrementa en fuerza, demostrando que el tratamiento puede asociarse con otras técnicas moldeadoras de la córnea<sup>128</sup>.

A nivel experimental y de forma novedosa en este campo, nuestro grupo de trabajo en el año 2009 diseña un estudio en la especie porcina consistente

en la implantación de Intacs® en ambos ojos y la posterior aplicación del tratamiento crosslinking en el ojo izquierdo<sup>129</sup>. En ambos ojos se produce un mayor aplanamiento, sin embargo, cuando procedemos a la explantación de los segmentos, se detecta un efecto parcial de reversión del aplanamiento producido en ambos ojos comparados con los valores preoperatorios<sup>129</sup>. En este sentido, y coincidiendo con los resultados de Chan *et al*<sup>127</sup> y Ertan *et al*<sup>130</sup>, se observó que el aplanamiento corneal era más marcado en los ojos tratados con riboflavina-UVA que en los no tratados, demostrando de esta forma el efecto aditivo aplanador de la combinación de estas dos técnicas<sup>129</sup>.

## PRK + tratamiento crosslinking

Recientemente, Kymionis *et al* han demostrado en sus estudios resultados prometedores combinando PRK con tratamiento crosslinking mostrando unas medias de valores queratométricos que permanecen estables a través de un periodo de seguimiento de 25 meses<sup>131</sup>. Adicionalmente, ninguno de los pacientes de este estudio muestra signos topográficos o clínicos de progresión del queratocono durante el periodo de seguimiento<sup>131</sup>. Sin embargo, los autores concluyen que esta combinación de técnicas es más apropiada para pacientes con queratoconos tempranos ya que las córneas más avanzadas de queratoconos más avanzados podrían excluir la posibilidad de retirada de tejido en la PRK<sup>131</sup>.

## NUEVAS TENDENCIAS

### *Crosslinking Corneal (Reticulación corneal) (CxL)*

La reticulación del colágeno es un proceso ampliamente conocido en los tejidos humanos asociado al envejecimiento<sup>132</sup>. Consiste en la creación de enlaces covalentes o iónicos que unen una macromolécula (polímero sintético o natural, ej. proteínas) a otra<sup>132</sup>.

Se produce de forma natural relacionada con el envejecimiento<sup>133</sup> y asociada a la diabetes<sup>134</sup>. Es un proceso ya empleado en diferentes especialidades de la medicina como por ejemplo la odontología<sup>135</sup>, para el curado de compuestos<sup>136</sup> con luz ultravioleta (fotopolimerización) o en cirugía cardiaca, para reducir el deterioro tisular de las válvulas cardiacas<sup>137</sup> o en injertos de meniscos.

La reticulación o crosslinking del tejido corneal, es una técnica sencilla y poco invasiva que consiste en una fotopolimerización de las fibras estromales de la córnea mediante la acción conjunta de una sustancia fotosensibilizante (riboflavina) y de radiación ultravioleta tipo A (UVA), durante 30 minutos a una distancia de la córnea de 1 cm<sup>138</sup>. El principio fundamental descrito por Gregor Wollensak en el año 2003 (ver Tabla 1) se basa en la excitación de la riboflavina por la radiación UVA<sup>138</sup>. En esta situación, la riboflavina, excitada por una reacción de fotooxidación, genera radicales del oxígeno (especies reactivas de oxígeno, ERO) que transforman grupos amino terminales de las cadenas laterales de las fibrillas de colágeno corneal en grupos aldehídos<sup>138</sup>. Seguidamente los grupos amino y los grupos aldehído forman enlaces covalentes entre cadenas laterales de colágeno<sup>138</sup>. La consecuencia directa de esta unión es un incremento de la rigidez corneal y por tanto mayor resistencia a la ectasia<sup>126, 138</sup>.

La idea de este tratamiento aplicado a nivel de la córnea surge en la Universidad de Dresden (Alemania) con la intención de detener el progreso de la enfermedad ectásica (en este caso centraron los estudios en el queratocono) o impedir la necesidad de una queratoplastia<sup>138</sup>. Las bases sobre las que se asentaron fueron que los pacientes diabéticos jóvenes no desarrollaban queratocono dado que la glucosa provocaba un efecto de crosslinking natural en las fibras de colágeno incrementado su resistencia<sup>134</sup>.

Realizando un análisis más profundo del uso del crosslinking como tratamiento de la ectasia corneal se señalan los factores más importantes del mismo.

## Profundidad del tratamiento

Andreassen *et al*, en 1980, apoyan el concepto de que una disminución de la resistencia mecánica juega un importante papel en la protrusión de la córnea en el queratocono<sup>20</sup>. En su trabajo desarrollado en la especie humana, enfrentan córneas queratocónicas con córneas normales en tests de fuerzas biomecánicas obteniendo valores de carga y de tensión menores en las córneas patológicas<sup>20</sup>. Describen la dureza de la córnea queratocónica como un 60% de la dureza de una córnea normal, demostrando que los cambios en el patrón de entrecruzamiento del colágeno tienen como consecuencia cambios biomecánicos<sup>20</sup>. En este mismo sentido realizan una digestión enzimática utilizando una solución digestiva compuesta principalmente por pepsina<sup>20</sup>. Las córneas normales tienen una digestión dos veces más alta que las córneas queratocónicas, señalando como causa la disminución de entrecruzamiento del colágeno<sup>20</sup>.

La primera incógnita que se plantea, y que todavía en la actualidad genera controversia, es si esa disminución del entrecruzamiento producida en el queratocono está presente en todo el espesor corneal (tal y como describen Pouliquen *et al* en su trabajo<sup>139</sup>) o por el contrario, este proceso degenerativo se produce sólo en la parte anterior del estroma corneal, hipótesis que confirman Iwamoto *et al* y McTigue en sus estudios histológicos<sup>140, 141</sup>.

En la córnea sana la estabilidad de la superficie anterior se atribuye a la orientación preferente de las lamelas de colágeno<sup>4</sup>.

Müller *et al*, en el año 2001, desarrollan un trabajo en el que demuestran que la arquitectura específica del estroma anterior es la responsable del mantenimiento de la curvatura corneal en la especie humana, incluso en casos de hidratación extrema, planteando la posibilidad de la aparición de problemas ópticos a largo plazo en técnicas como la queratectomía refractiva (PRK) porque es necesaria la retirada de la parte anterior de la córnea y la cirugía por láser (LASIK) dado que se levanta un flap estromal anterior<sup>18</sup>. En sus estudios

histológicos, las diferencias entre la distribución de las lamelas de colágeno entre estroma anterior y posterior es muy clara, evidenciando un entrelazado más apretado entre las lamelas del estroma anterior incluso en casos de hidratación no fisiológica<sup>18</sup>.

Müller *et al* prueban diferentes grados de hidratación corneal manteniendo unas muestras corneales de 450 µm sumergidas durante diferentes tiempos<sup>18</sup>. A diferencia de la arquitectura anterior, la organización de la parte estromal de la córnea, empieza a perderse a las primeras 24 horas día siguiente de la inmersión en una solución salina tamponada con fosfato (PBS)<sup>18</sup>. En este tiempo, la membrana de Descemet sufre unas ondulaciones y el grosor corneal alcanza los 650 µm, los queratocitos son más cortos y gruesos y no se presenta espacio entre las lamelas de colágeno<sup>18</sup>. En las pruebas de inmersión en agua puede llegar a alcanzar los 1200 µm en 24 horas<sup>18</sup>. En este caso, los queratocitos, pierden su morfología original alargada, la forma del núcleo es irregular y apenas se aprecia un delgado borde de citoplasma alrededor<sup>18</sup>. No obstante, pueden diferenciarse todavía las lamelas de colágeno onduladas<sup>18</sup>. Los resultados de este estudio llevan a los autores al hallazgo de una zona de 100-120 µm por debajo de la membrana de Bowman que no está afectada por las condiciones extremas de hidratación, hallazgo que se interpreta como consecuencia de la arquitectura específica de la parte anterior del estroma con un entrelazado más apretado y con la diferente composición de los proteoglicanos en ambas partes<sup>18</sup>.

Teniendo como base estos trabajos, el tratamiento crosslinking se centra en crear nuevos puentes entre las fibras de colágeno para obtener una mayor rigidez en la córnea<sup>138</sup>. Dado que una distribución homogénea del entrecruzamiento en todo el estroma parece poco probable y que varios estudios sugieren que el entrecruzamiento se produce sobre todo en el estroma anterior<sup>142</sup> (aproximadamente los primeros 200 µm), Kohlhaas *et al* realizan en el año 2006 su estudio dividiendo el estroma en dos partes, anterior y posterior para evaluar la distribución real del efecto del trata-

miento crosslinking y determinar en cuál de las dos partes el tratamiento es más efectivo<sup>143</sup>. En su investigación, utilizan 40 ojos enucleados de la especie porcina de menos de 6 horas postmortem y 10 ojos de la especie humana de menos de 48 horas postmortem<sup>143</sup>. Tras retirar el epitelio de 20 ojos de la especie porcina y 5 ojos de la especie humana, aplican la riboflavina (0,1%, 10 mg riboflavina-5-fosfato en 10 ml de solución de dextrano T500 al 20%) y seguidamente la luz UVA (370 nm, 3 mW/cm<sup>2</sup>) siguiendo el protocolo descrito por Wollensak<sup>138</sup> (irradiación durante 30 minutos durante la cual se aplican dos gotas de la solución de riboflavina cada 5 minutos)<sup>143</sup>. En el grupo control (20 ojos de la especie porcina y 5 ojos de la especie humana) realizan una desepitelización de la córnea pero no aplican el tratamiento crosslinking<sup>143</sup>. Como se ha comentado anteriormente, para evaluar el efecto del tratamiento crosslinking a través del estroma en este trabajo, se obtienen dos tiras de la córnea (la orientación del corte se realiza de superior a posterior) y se procesan por separado mediante el uso de la paquimetría para la obtención del espesor de la muestra<sup>143</sup>. Kohlhaas *et al* determinan en su estudio que el 65-70% de la irradiación es absorbida por los primeros 200 µm del estroma, mientras que sólo un 20% alcanza los 200 µm posteriores<sup>143</sup>. Este efecto localizado puede deberse a la acción de la riboflavina y a su difusión en el estroma<sup>143</sup>.

En el año 2006, el grupo de trabajo de Seiler *et al* describen por primera vez, por medio de la utilización de la lámpara de hendidura, la aparición de una línea de demarcación a unos 300 µm de profundidad en el estroma de córneas queratocónicas de la especie humana tras la aplicación del tratamiento crosslinking<sup>144</sup>. Esta línea de demarcación descrita en este estudio se hace visible a las dos semanas de la aplicación de la riboflavina/UVA y se explica como la línea que representa la demarcación entre la parte de córnea tratada de la no tratada<sup>144</sup>. Esta explicación reafirma los estudios de Caporossi *et al*, en los que por medio de la microscopía confocal, identifican diferentes áreas de orientación vertical y lateral a una profundidad de 270 µm-330 µm en córneas humanas tratadas con riboflavina/UVA<sup>145</sup>.

Los resultados de los estudios de Kohlhaas *et al*<sup>143</sup> y de Seiler *et al*<sup>144</sup> confirman los anteriormente realizados por Wollensak *et al* que plantean la hipótesis de un mayor efecto del tratamiento crosslinking en la parte anterior de la córnea, apoyando la teoría de la dependencia del efecto del tratamiento en función de la profundidad estromal<sup>126, 138, 146</sup>.

En el año 2007, Wollensak *et al* describen un cambio importante en la hidratación corneal<sup>147</sup>. Realizan la técnica de crosslinking en 20 ojos enucleados de cerdo y los incuban durante 24 horas en una cámara húmeda<sup>147</sup>. Se observan 3 zonas del estroma corneal con diferentes grados de edema<sup>147</sup>. La zona más anterior (242  $\mu\text{m}$ ) no presenta signos de edema, una zona intermedia (238  $\mu\text{m}$ ) ligeramente edematizada y la zona más profunda se presenta con un intenso edema<sup>147</sup>. Este estudio reafirma la teoría de la localización anterior del efecto crosslinking<sup>147</sup>.

Kanellopoulos *et al*, introducen el análisis cuantitativo de alta resolución del segmento anterior mediante tomografía de coherencia óptica (OCT, técnica no invasiva) para determinar la profundidad y extensión de los cambios producidos en el estroma anterior de la córnea inducidos por el tratamiento crosslinking<sup>148</sup>. En su estudio, comparan un grupo de 50 pacientes (100 ojos) con córneas sanas frente a un grupo de 47 pacientes (94 ojos) con queratocono previamente tratados con crosslinking mediante protocolo de Atenas<sup>148, 149</sup>. En el estudio de Seiler *et al*, anteriormente descrito, se describe la línea de demarcación como la transición entre la zona tratada y la zona no tratada mediante crosslinking detectada con la lámpara de hendidura<sup>144</sup>. Esta línea no parece afectar a la visión, sólo corresponde a cambios en la densidad del estroma y aparece como una zona hiperreflectiva en las imágenes de OCT<sup>148</sup>. En las imágenes tomadas, la media del grosor corneal del grupo tratado es de 432  $\mu\text{m}$  y la extensión, es decir, la profundidad alcanzada por el tratamiento, es de 305,6  $\mu\text{m}$  (aproximadamente el 70,98% del espesor corneal)<sup>148</sup>. Con el tiempo, los cambios en la densidad se hacen menos evidentes, la tendencia es negativa, indicando que el área de demarcación

se va desvaneciendo a partir de los 12 meses de realizado el tratamiento<sup>148</sup>.

## Citotoxicidad del tratamiento

La radiación ultravioleta de 370 nm actúa como fotosensibilizante de la riboflavina, en los estudios de Wollensak *et al* se estima que la energía adecuada es de 3.00 mW/cm<sup>2</sup> y que produce una apoptosis de los queratocitos hasta una profundidad de 300  $\mu\text{m}$  en el espesor<sup>150, 151</sup>.

La dosis aplicada durante el procedimiento crosslinking es de 5,4 J/cm<sup>2</sup> durante 1800 sg, lo que excede los valores de la International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (1 J/cm<sup>2</sup> durante menos de 1000 sg)<sup>123</sup>. Si se aplica la dosis recomendada sobre una córnea virgen, sólo sería filtrada por esta un 30%, llegando a las estructuras oculares una dosis de 2,10 mW/cm<sup>2</sup>, siendo absorbida por el cristalino el 50 % y el resto por la retina<sup>123</sup>. Cuando se aplica la radiación en una córnea desepitelizada y embebida en riboflavina, esta actúa como filtro limitando el paso de energía a 0,09 mW/cm<sup>2</sup>, cantidad que ya no es tóxica para el resto de estructuras intraoculares<sup>123</sup>.

La seguridad del tratamiento tiene mayor importancia en la existencia o no de daños en el endotelio corneal<sup>123</sup>. Los estudios realizados determinan que si esta capa se afecta es debido a que la córnea es excesivamente fina a la hora de realizar el procedimiento, de ahí que uno de los principales requisitos de la aplicación de este tratamiento sea el control del espesor corneal, que debe ser mínimo 400  $\mu\text{m}$ <sup>125, 126, 152, 153</sup>.

Los umbrales citotóxicos calculados para la energía UVA son para los queratocitos de 0,5 mW/cm<sup>2</sup> produciéndose citotoxicidad en las 270  $\mu\text{m}$  superficiales del estroma corneal, y de 0,3 mW/cm<sup>2</sup> para el endotelio<sup>151-153</sup>. Estos niveles en el endotelio sólo se alcanzan cuando la córnea tiene un grosor menor de 350  $\mu\text{m}$ , a lo que se añade un colchón de seguridad de 50  $\mu\text{m}$ <sup>123, 152</sup>. Esto condiciona una de las premisas de esta técnica, sólo

se puede aplicar en córneas de más de 400  $\mu\text{m}$ <sup>125, 152, 153</sup>. En un estudio del año 2010 realizado por Wollensak en un paciente de 23 años, la histología obtenida muestra una pérdida total de queratocitos entre los 250-280 $\mu\text{m}$  en el estroma anterior, mostrando una membrana de Descemet y un endotelio intactos<sup>154</sup>, confirmando lo descrito en *in vitro* y en animales<sup>125, 150, 153</sup> y demostrando el alto grado de seguridad del tratamiento si se cumplen los requisitos de espesor corneal<sup>125, 152, 153</sup>. En el mismo sentido, Goldich *et al* evalúan el posible daño durante el tratamiento riboflavina/UVA al resto de estructuras oculares en 14 ojos con queratocono progresivo<sup>155</sup>. A lo largo de los tiempos de seguimiento (1 semana; 1, 3, 6 y 12 meses) se analizan el endotelio y la retina confirmando la ausencia de pérdida de densidad endotelial así como alteraciones en la mácula, cambios en su grosor o áreas de hiperreflectividad en la retina<sup>155</sup>. Este análisis de retina se basa en su anatomía por lo que consideran necesario realizar estudios de electroretinografía (ERG) para evaluar su funcionalidad<sup>155</sup>.

Es fundamental conocer los posibles efectos perjudiciales de la radiación UVA en las estructuras oculares antes de aplicar este tratamiento<sup>156, 157</sup>.

En los años 80, Ringvold *et al* realizan diversos trabajos para evaluar los efectos de la radiación de la luz UV en córneas de la especie cunicula en sus distintas capas y en el humor acuoso<sup>156</sup>. Gracias al uso de la microscopía electrónica los resultados obtenidos demuestran una capacidad notable de recuperación de la córnea frente a la agresión producida por la radiación<sup>156</sup>. Los daños a nivel de todas las capas corneales son instantáneos al igual que la destrucción de los queratocitos, sin embargo, la recuperación es íntegra al cabo de una semana<sup>156</sup>. Wollensak *et al* muestran, en el año 2007, en su trabajo una serie de cortes histológicos en los que revelan la extensión de la apoptosis en córneas de conejo y cómo se inicia el proceso llegando a las 4-6 semanas a la repoblación de los queratocitos en el estroma y a la separación de las células endoteliales<sup>157</sup>.

Cullen *et al* y Riley *et al* demuestran en córneas

de la especie cunicula, un daño endotelial a largo plazo tras la exposición de luz ultravioleta tipo B (UVB) que es puntual y no acumulativo, incluso tras exposiciones muy intensas<sup>158, 159</sup>. Sin embargo, plantean la hipótesis de que una exposición crónica a esta radiación puede acelerar el envejecimiento fisiológico de la córnea<sup>158, 159</sup>.

En resumen, es fundamental la presencia de riboflavina para reducir el daño potencial de la radiación de UVA sobre el cristalino y retina<sup>151</sup>.

En el año 2012, Kanellopoulos muestra su interés en reducir el tiempo de radiación estromal incrementando el flujo de aplicación de la luz ultravioleta, lo que posiblemente puede reducir la pérdida de queratocitos en el estroma<sup>149</sup>. En su estudio, los resultados y los efectos adversos obtenidos con el uso de alto flujo de luz ultravioleta con un tiempo de radiación más corto son comparables a los obtenidos con el protocolo estándar del tratamiento<sup>149</sup>. Este autor plantea la hipótesis de que el uso del protocolo con alto flujo de luz ultravioleta puede tener un efecto “desinfectante” reduciendo el riesgo postoperatorio de queratitis infecciosas<sup>149</sup>.

Para seguir evaluando la toxicidad de este tratamiento, Wollensak *et al* diseñan un estudio experimental para evaluar el posible daño que se puede producir en el epitelio limbal y conjuntival por una irradiación accidental<sup>160</sup>. Para ello utiliza 6 conejos que divide en 2 grupos: 3 conejos reciben el protocolo estándar y los otros 3 reciben la radiación UVA y una solución de dextrano sin riboflavina<sup>160</sup>. Se irradian 3 mm del epitelio central corneal y 3 mm hacia conjuntiva manteniendo en el centro el limbo corneal<sup>160</sup>. A las 24 horas de la aplicación se realiza una prueba con fluoresceína para evaluar el epitelio, y se observa tinción negativa, ausencia de erosión, epitelio brillante y liso así como ausencia de congestión en la conjuntiva<sup>160</sup>. Se aplica este intervalo de 24 horas porque estudios previos confirman que es el pico del tiempo de apoptosis celular post-radiación<sup>150-153, 157</sup>. Una vez realizada la prueba de tinción de fluoresceína se procede al sacrificio humanitario de los animales y a la toma

de muestras para su análisis histológico<sup>160</sup>. En las tinciones obtenidas no se observan defectos epiteliales en conjuntiva o limbo ni presencia de infiltrados<sup>160</sup>. En la realización de la técnica de TUNEL, no se aprecian cambios apoptóticos en queratocitos o endotelio con/sin riboflavina<sup>160</sup>. No hay efectos citotóxicos en las células<sup>160</sup>, mientras que en crosslinking transepitelial hay apoptosis en el estroma anterior y un engrosamiento biomecánico más reducido<sup>161</sup>. La única limitación de este estudio es la especie utilizada dado que el grosor epitelial del conejo es de 50-70µm que es similar al humano, pero no posee membrana de Bowman y presenta vasos superficiales en el estroma anterior al limbo<sup>160</sup>.

En cuanto a la toxicidad que puede producir el efecto crosslinking sobre los nervios presentes en el estroma corneal, Wasilewski *et al* plantean un estudio para evaluar la sensibilidad corneal en pacientes que han tenido queratocono progresivo y se han sometido a este tratamiento<sup>162</sup>. Se aplica el protocolo estándar<sup>138</sup> a 36 pacientes (72 ojos) y se registran las respuestas mediante un estesiómetro. La recuperación de la sensibilidad corneal va aumentando a lo largo de los 6 meses pero no llega a los mismos valores que antes de la realización del tratamiento<sup>162</sup>.

## Riesgo térmico del tratamiento

Otra posibilidad de la irradiación de luz ultravioleta (UV) (además de las comentadas en el apartado anterior) sobre la superficie corneal es el daño térmico<sup>163</sup>. La luz UV es fuertemente absorbida por el tejido corneal y puede desembocar en una disipación de calor por el tejido causando daño térmico<sup>163</sup>.

La córnea no presenta vasos sanguíneos y es una superficie expuesta al aire de forma continua, lo que demuestra la importancia de mantener una temperatura baja durante cualquier cirugía incluso si es intraocular<sup>4</sup>. En un estudio realizado

en córneas de conejo en el año 2005 por el grupo de Mencucci *et al*, se evalúa el daño térmico producido por la cirugía de cataratas<sup>164</sup>. Según los resultados, las córneas demuestran una tolerancia a la temperatura hasta alcanzar los 50° C, una vez sobrepasado este valor, se empieza a observar una desorganización en las fibras de colágeno con un leve edema estromal y signos de daño en los queratocitos<sup>164</sup>.

Centrando la revisión bibliográfica en el tratamiento crosslinking, se puede intuir un daño térmico ya que mientras que la potencia de la fuente de luz usada se mantiene baja (3 mW/cm<sup>2</sup>), la duración (30 min) es considerable<sup>163</sup>. La irradiación UV induce un efecto fotoquímico en la solución de riboflavina, sin embargo, no se debe descartar un efecto térmico como daño colateral<sup>163</sup>.

En el año 2004, Spoerl *et al* describen el comportamiento termo-mecánico de córneas de ojos enucleados de la especie porcina sometidas a crosslinking en base a la temperatura de contracción de las fibras de colágeno (75°)<sup>142</sup>.

Corvi *et al*, describen una idea en el año 2006 para controlar el daño térmico<sup>165</sup>. La realización de una monitorización termográfica *in vivo* con métodos no invasivos durante cualquier tipo de cirugía, ya sea refractiva o intraocular<sup>165</sup>. Esta adquisición de imágenes térmicas no altera la temperatura del ojo y permite un análisis de la distribución del calor en la superficie corneal a tiempo real en los puntos seleccionados por el cirujano<sup>165</sup>.

El primer trabajo realizado *in vivo* en córneas humanas se realiza en el año 2007, en el que Mencucci *et al* realizan un estudio para evaluar el daño térmico que puede producir la radiación UVA en la superficie corneal usando termocámaras infrarrojas de superficie<sup>166</sup>. En ninguna fase del experimento se supera la temperatura umbral de daño térmico concluyendo que este procedimiento es seguro y que no causa daños térmicos en la superficie corneal<sup>166</sup>.

## Modificación en la resistencia

El efecto biomecánico que produce esta técnica en la córnea se ha medido usando equipos de tensión y estrés de biomateriales y muestra unos resultados de 328,9 % en córneas humanas y un 71,9 % en córneas de cerdo<sup>126</sup>. El hecho de que se produzca un mayor efecto biomecánico en córneas humanas se debe a que el entrecruzamiento que produce el procedimiento crosslinking es máximo sólo en las 300  $\mu\text{m}$  anteriores y las córneas humanas tienen un espesor de 550  $\mu\text{m}$ , frente a las córneas porcinas que poseen un espesor de 850  $\mu\text{m}$ <sup>126</sup>. En el año 2009, el mismo grupo de trabajo realiza un estudio similar para evaluar a medio-largo plazo las propiedades biomecánicas que obtiene la córnea de conejo *in vivo* tras recibir la combinación de riboflavina/UVA<sup>167</sup>. Se utilizan 9 conejos a los que se les aplica el tratamiento en el ojo derecho manteniendo el ojo izquierdo como control<sup>167</sup>. Las muestras se toman a los 3 y 8 meses de la aplicación del crosslinking<sup>167</sup>. El grosor corneal de las muestras tratadas fue significativamente menor ( $408 \pm 20 \mu\text{m}$ ) que el obtenido en el grupo control ( $422 \pm 12 \mu\text{m}$ ), así como una fuerza biomecánica mayor por un incremento de la rigidez corneal que se mantiene hasta los 8 meses<sup>167</sup>. Concretamente el efecto crosslinking produce un incremento de la rigidez corneal del 85%<sup>167</sup>, mientras que en cerdo es de 70% y en humana del 320%<sup>126</sup>. El reducido efecto en córneas de conejo respecto al producido en humana puede explicarse por las propiedades intrínsecas de la matriz de colágeno en estos animales y por el coeficiente de absorción de la riboflavina en humanos (coef. absorción 70) que es mayor que en conejos (coef. absorción 63)<sup>123, 167</sup>.

La estabilidad biomecánica que produce el tratamiento crosslinking puede ser explicada por los cambios en la estructura terciaria de las fibras de colágeno (creación de nuevos enlaces)<sup>163</sup>. Carlson *et al*, en el año 1988, realizan un trabajo en el que se sumergen córneas de la especie cunicula en una solución enzimática compuesta exclusivamente por pepsina<sup>168</sup>. Los resultados se analizan por medio de la utilización de la microscopía electrónica, mostrando una pérdida del entrecruzamiento de las

fibras paralelas y dejando sólo unas pocas fibras de colágeno intactas en el estroma<sup>168</sup>.

Para evaluar el incremento de rigidez que produce el tratamiento crosslinking, el grupo de Spoerl *et al*, diseñan un estudio en el año 2004 para determinar la resistencia de córneas de la especie porcina tratadas con este procedimiento frente a una solución de enzimas colagenasas, y para completar la evaluación de la eficacia del tratamiento, se completa el panel enzimático utilizando pepsina y tripsina<sup>146</sup>.

Para la digestión enzimática por tripsina es necesario desnaturalizar previamente mediante el uso del calor las fibras de colágeno ya que la digestión por tripsina es sólo posible después de esa desnaturalización parcial de las regiones helicoidales del colágeno<sup>146</sup>. Debido a esto, el tiempo empleado en la digestión por tripsina fue menor que en las otras dos digestiones debido presumiblemente a que los puentes de las fibras de colágeno estaban parcialmente destruidos antes de la digestión<sup>146</sup>.

En las secciones histológicas, se detectaron cambios en el estroma posterior donde el grado del efecto crosslinking es más bajo debido a la reducción del 95 % de la irradiación que se produce por la absorción de la misma a lo largo del estroma corneal<sup>146</sup>. Como conclusión en este estudio se obtiene un incremento en el tiempo de digestión de las muestras corneales tratadas por crosslinking por encima de las muestras no tratadas, lo que quiere decir un incremento a la resistencia frente a la pepsina, tripsina y colagenasas, especialmente en la mitad del estroma<sup>146</sup>.

Estos últimos datos refuerzan la teoría del uso del crosslinking para las úlceras corneales<sup>169</sup>, especialmente las *melting*, dado que uno de los principales mecanismos en esta patología es el incremento de la actividad colagenolítica<sup>6</sup>.

En el año 2004, y ya en el animal vivo, este grupo de trabajo, demuestra un incremento en el diámetro de las fibras de colágeno en córneas de la especie cunicula del 12,2 % ( $3,96 \pm 2,5 \text{ nm}$ )<sup>170</sup>. El

objetivo de este estudio es el de evaluar el efecto directo del procedimiento crosslinking sobre el diámetro de las fibras de colágeno de la córnea del conejo<sup>170</sup>. Utilizan 10 animales de la especie cunicula de la raza Neozelandesa a los cuales les aplica la riboflavina seguida de la irradiación con luz UVA en el ojo derecho manteniendo el ojo izquierdo como control<sup>170</sup>. Comparando los ojos tratados con los ojos control, frente al incremento del 12, 2% en el diámetro de las fibras de la parte anterior del estroma, comentado anteriormente, los resultados muestran sólo un incremento del 4,6% ( $1,63 \pm 1,45\text{nm}$ ) en las fibras de la parte posterior del estroma<sup>170</sup>. Otro dato significativo de este estudio es que dentro del mismo ojo tratado con crosslinking se detecta un incremento del 9,3% ( $3,1 \pm 2,1 \text{ nm}$ ) en el diámetro de las fibras en la parte anterior del estroma comparado con la parte posterior<sup>170</sup>.

Gracias a este estudio se asume que el tratamiento crosslinking, aparte de la creación de nuevos enlaces entre moléculas, es capaz de incrementar el diámetro de las fibras de colágeno, ayudando con esto al incremento de la estabilidad biomecánica de la córnea<sup>170</sup>, estabilidad que Caporossi *et al* establecen en un 92% de los casos de queratocono realizados<sup>171</sup>. La explicación del mayor efecto en la parte anterior del estroma se debe a la pérdida de acción conforme avanza la irradiación desde anterior a posterior, llegando a este sólo un 5% de la misma<sup>170</sup>.

En el año 2010, Mencucci *et al* evalúan los efectos del tratamiento crosslinking en los queratocitos y en las fibras de colágeno en 15 botones corneales de la especie humana<sup>172</sup>. El análisis inmunohistoquímico del colágeno tipo I demuestra un incremento significativo en el diámetro de las fibras de colágeno que han recibido el tratamiento crosslinking<sup>172</sup>. En cuanto a la población de queratocitos, los autores informan que inicialmente este tratamiento produce un daño en este tipo celular pero que a los 6 meses de su aplicación se observa una repoblación de queratocitos llegando a igualarse a la población en una córnea sana<sup>172</sup>.

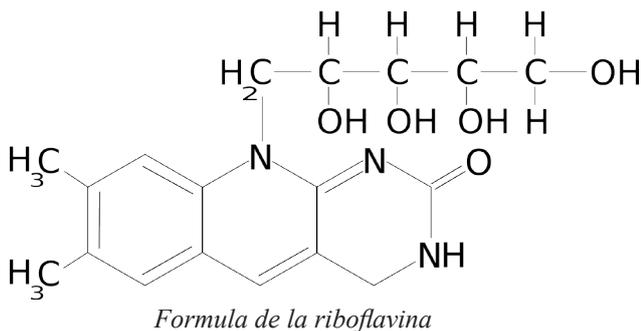
Para evaluar los posibles cambios en la cohesión interlamelar después de la aplicación del tratamiento crosslinking, Wollensak *et al* diseñan un estudio en el año 2011 con 72 ojos enucleados de porcino, en el cual establecen 6 grupos con diferentes tratamientos en los que se incluyen un grupo control sin tratamiento, un grupo con la aplicación de crosslinking estándar, un grupo tratado con crosslinking hipoosmolar (riboflavina sin dextrano), un grupo con la córnea “tumefacta” (24 h en suero salino) sin crosslinking, un grupo tratado con formaldehído y un grupo tratado con alfa-amilasa (estos dos últimos sin aplicación de crosslinking)<sup>173</sup>. Los resultados de este estudio muestran que el grupo crosslinking no tiene un efecto significativo de cohesión interlamelar en el estroma anterior<sup>173</sup>. Los entrecruzamientos son principalmente intra e interfibrilar, pero no interlamelar<sup>173</sup>. Ese mismo año, McCall *et al* revelan que los entrecruzamientos de colágeno inducidos por el tratamiento crosslinking se basan en enlaces covalentes químicos que incluyen grupos carbonilos y aminos<sup>174</sup>.

En un estudio elaborado por Akhtar *et al* se comparan muestras de córnea sanas, de córneas queratocónicas y de córneas queratocónicas tratadas con riboflavina/UVA<sup>31</sup>. Se realiza un análisis a nivel estructural que determina una mejoría en la distribución de las fibras de colágeno, el diámetro de las mismas y el espacio interfibrilar en las córneas queratocónicas tras la aplicación del tratamiento crosslinking<sup>31</sup>. Se evidencia una estructura de disposición horizontal de las lamelas de colágeno de las muestras tratadas, frente a la estructura de disposición ondulada que adoptan en una córnea queratocónica, así como una distribución uniforme y conectadas entre ellas con filamentos de proteoglicanos, confirmando de esta forma el efecto del tratamiento crosslinking en el estroma<sup>31</sup>. El diámetro observado en las fibras de colágeno de las fibras que han recibido el tratamiento es significativamente mayor que las córneas queratocónicas sin tratamiento<sup>31</sup>. Mientras que las fibras de colágeno de las córneas queratocónicas tienen un rango de 15-25 nm, la mayoría de las fibras de

colágeno de las córneas sanas y queratocónicas con tratamiento crosslinking tienen un rango de diámetro aproximado de 20-30 nm<sup>31</sup>. Según los autores, los resultados clínicos y análisis estructurales realizados a las córneas queratocónicas sometidas a tratamiento crosslinking sugieren que dicho tratamiento transforma la arquitectura del estroma de las córneas patológicas en estroma corneal sano, aunque señalan la importancia de realizar mayor número de estudios en este sentido<sup>31</sup>.

## Uso de la riboflavina

La riboflavina o vitamina B<sub>2</sub> tiene una fórmula empírica de C<sub>17</sub>H<sub>2</sub>ON<sub>4</sub>O<sub>6</sub> y al disolverse en el agua toma una coloración entre naranja y amarillo<sup>123</sup>. Su pico de absorción máxima es a 370 nm<sup>123, 175</sup>.



Tiene una misión doble, por una parte va a ser activada por la radiación ultravioleta (produciendo liberación de radicales libres) y por otra actúa como un filtro de las radiaciones UVA permitiendo que sólo un 5 % de la energía aplicada pase a las estructuras intraoculares, evitando de esta forma el daño térmico de la membrana de Descemet y del endotelio<sup>123</sup>. Para que la riboflavina sea adecuadamente absorbida debe retirarse el epitelio<sup>176, 177</sup>. En la solución que se aplica de riboflavina se incorpora dextrano al 20 % para mantener la presión osmótica de la córnea desepitelizada e impedir modificaciones de grosor<sup>123</sup>. En el año 2010, Wollensak *et al*, valoran el papel del film preocular de la riboflavina sometiendo botones corneales de donantes humanos y córneas porcinas post-mortem a diferentes soluciones de riboflavina: solución estándar con dextrano (grosor film de 70µm), solución de riboflavina con metilcelulosa

(grosor film de 300µm) y solución de riboflavina hipoosmolar sin dextrano (grosor film de 40µm)<sup>178</sup>. El film de riboflavina es vital en la absorción y blindaje de la luz UVA lo cual es esencial para el endotelio<sup>178</sup>. La absorción de luz UVA es similar en los tres tipos de soluciones, aunque el dextrano tiene un débil efecto deshidratante en córnea humana, las córneas artificialmente engrosadas puede perder efecto biomecánico y la solución hipoosmolar puede poner en riesgo el endotelio si el estroma tiene un grosor artificial de 400µm<sup>178</sup>. Los autores concluyen que el tratamiento con la solución estándar de riboflavina es la más estable y confiable<sup>178</sup>.

Kapasi *et al* en el año 2012, plantean un estudio en el que comparan la forma tradicional de retirada del epitelio de forma mecánica (con una hemosteta) con la utilización de la PTK en 34 pacientes que se someten a tratamiento crosslinking<sup>179</sup>. En el grupo de PTK-crosslinking (17 ojos) se obtiene una media de espesor de 477±7,1 µm mientras que en el grupo de crosslinking con retirada tradicional del epitelio tiene una media de 489±5,6 µm<sup>179</sup>. La PTK se ajusta para una profundidad de 50µm<sup>179</sup>. A la semana de aplicación del tratamiento en ambos grupos se observa una resolución epitelial completa<sup>179</sup>. Aunque no hay una diferencia significativa, el grupo de PTK reduce el error refractivo con una tendencia a mejores resultados pese a que se necesitan más estudios con más tiempo de observación<sup>179</sup>.

En los últimos años ha surgido el debate sobre la necesidad real de retirarse el epitelio, más con la aparición de una riboflavina transepitelial que puede ser absorbida por el epitelio<sup>180</sup>. Según defendió Pinelli, en el Congreso Internacional de Crosslinking Corneal celebrado en Zurich (Suiza, 2006), los resultados que se obtienen sin retirar el epitelio son similares a los obtenidos sin desepitelizar, pero hasta la fecha no se han publicado datos fiables<sup>180, 181</sup>. La desepitelización que se realiza para la aplicación del protocolo estándar conlleva aparición de dolor, sensación de cuerpo extraño y disconfort<sup>182</sup>. Además, el debridamiento epitelial reduce el espesor total corneal y puede conllevar graves repercusiones en las córneas extremada-

mente finas<sup>182</sup>.

Se han realizado una serie de estudios para mejorar la permeabilidad de la riboflavina a través de un epitelio corneal intacto<sup>161, 183-185</sup>. En el 2010, Leccisotti *et al*, utilizan una combinación de gentamicina, cloruro de benzalconio (BAC) y EDTA previa a la utilización de la solución de riboflavina transepitelial<sup>161</sup>. Los resultados ofrecen una mejoría visual en los ojos tratados con respecto a los ojos no tratados aunque el efecto es limitado y favorable, es menos pronunciado que el que se produce con el crosslinking estándar<sup>161</sup>. Ese mismo año, Kissner *et al*, diseñan un estudio experimental en 32 córneas de conejo para evaluar el efecto biomecánico del método crosslinking dejando el epitelio intacto (epi-on) y aplicando cloruro de benzalconio a diferentes concentraciones<sup>183</sup>. Los coeficientes de absorción, los valores de tensión y módulo de Young y la resistencia a la digestión enzimática de las soluciones con BAC incrementaron significativamente respecto al grupo de solución de riboflavina estándar<sup>183</sup>. El grupo de tratamiento con concentración de BAC al 0,02% induce suficiente permeabilidad epitelial, comparable al protocolo estándar<sup>183</sup>. Raiskup *et al*, realizan en el 2012 un estudio similar en 36 córneas de conejo valorando también diferentes concentraciones de cloruro sódico (NaCl), obteniendo como resultado que la solución de riboflavina + 0,01% BAC + 0,44% NaCl incrementa la permeabilidad<sup>184</sup>. Otras estrategias que se plantean para mejorar la permeabilidad incluyen la realización de microabrasiones corneales, colocación de esponja en saco conjuntival como depósito de riboflavina y prolongar el tiempo de inducción de la misma<sup>185</sup>.

Caporossi *et al* realizan un importante estudio a nivel microestructural con microscopía confocal para evaluar los efectos del tratamiento crosslinking transepitelial (TE-CxL) en pacientes queratocónicos<sup>186</sup>. Una muestra de 10 pacientes con una media de grosor corneal de 350-390  $\mu\text{m}$ , se someten a TE-CxL con EDTA siguiendo el protocolo de Siena<sup>145, 186</sup>. En los seguimientos realizados a 1, 3 y 6 meses postoperatorio se analizan el epitelio, nervios, apoptosis de los queratocitos, cambios estromales y endotelio<sup>186</sup>. Los resultados

obtenidos fueron los siguientes<sup>186</sup>:

- Epitelio: las células basales poseen bordes irregulares y la reflectividad intracelular está incrementada. A los 3 meses va bajando esa reflectividad para tener a los 6 meses un patrón mosaico normal.
- Nervios: apariencia normal de collar de perlas.
- Apoptosis queratocitos/modificaciones estromales: la apoptosis es variable, superficial y de manera desigual. La profundidad de este efecto se detecta a 140 $\mu\text{m}$ , confinado a estroma anterior, y en algunos casos no excede de 50  $\mu\text{m}$ . El edema corneal presente a los 15 días va bajando y empieza una modesta repoblación. A los 3 meses no hay presencia de edema y se ha producido una completa repoblación de queratocitos, a los mismos tiempos que en los estudios de Mencucci *et al*<sup>187</sup>. A los 6 meses no se aprecia ningún cambio.
- Endotelio: no varía el número de las células endoteliales ni el patrón de mosaico.

El efecto tóxico se produce por fotonecrosis y apoptosis, no se pierden nervios estromales a diferencia del tratamiento estándar (con retirada del epitelio), aunque en este último regeneran rápidamente<sup>186</sup>. En esta modalidad transepitelial no se aprecian las bandas en el estroma que se observan en el tratamiento estándar como signo de colágeno renovado y compactación lamelar<sup>186</sup>. Los autores concluyen que la penetración más reducida e irregular de la solución de riboflavina puede limitar el efecto biomecánico reduciendo así la posibilidad de estabilizar el queratocono a largo plazo<sup>186</sup>. Se necesitan más estudios en esta dirección para lograr una mayor homogeneidad de penetración<sup>185</sup> y su concentración<sup>186</sup>, así como la valoración de la extensión y los efectos biomecánicos que conlleva<sup>187</sup>.

Filippello *et al* presentan en el año 2012 un estudio de 20 pacientes con queratocono bilateral progresivo a los que se les aplica el TE-CxL (solución riboflavina+EDTA) en un ojo, manteniendo el ojo contralateral como control sin tratamiento<sup>188</sup>.

Los pacientes fueron examinados semanalmente durante 1 mes y posteriormente a los 3, 6, 12 y 18 meses<sup>188</sup>. El 40% de los pacientes presenta hiperemia y sensación de cuerpo extraño las primeras 24 horas postoperatorio que remiten espontáneamente<sup>188</sup>. En general en los ojos tratados hay una mejora significativa en agudeza visual y queratometrías frente a los no tratados donde se observa una tendencia al empeoramiento<sup>188</sup>. Los autores concluyen en la idoneidad de esta modalidad para evitar la debridación epitelial en pacientes pediátricos, no cooperantes y córneas delgadas con un grosor aproximado de 380 $\mu\text{m}$ <sup>188</sup>. Estos pacientes se someten a microscopía confocal para evaluación de las capas corneales<sup>189</sup>. A las dos semanas de aplicación del tratamiento la capa epitelial se encuentra recuperada, los queratocitos y las fibras nerviosas se encuentran disminuidos pero alcanzan su densidad normal a los 6 meses<sup>189</sup>. Se detecta una línea de demarcación 60 $\mu\text{m}$  por debajo de la membrana de Bowman a los 6 meses<sup>189</sup>.

La aplicación de la solución de riboflavina transepitelial tiene 3 principales limitaciones: la penetración de la radiación UVA es limitada, la penetración de la riboflavina no es homogénea<sup>190</sup> y se utiliza la misma potencia de luz UVA que en protocolo estándar<sup>191</sup>. En un estudio realizado en el año 2013 por Caporossi *et al* en pacientes con historial de queratocono progresivo, se observa cómo el crosslinking transepitelial no produce una mejoría significativa a los 24 meses de su aplicación, llegando a tener valores similares a los preoperatorios en incluso en algunos casos necesitando un tratamiento<sup>191</sup>. Con estos resultados, consideran que este procedimiento puede no fortalecer suficientemente la córnea para producir una estabilidad a largo plazo, tal y como sí aporta el tratamiento estándar en la actualidad<sup>191</sup>. No obstante parece más indicado en pacientes mayores de 26 años y con un grosor corneal de menor de 400 $\mu\text{m}$ <sup>191</sup>.

Un estudio mediante imagen confocal e inmunofluorescencia en ojos enucleados de porcino y realizado por Bottós *et al*, en el año 2008, demuestra que sin previa desepitelización corneal, el crosslinking no afecta a la organización del coláge-

no tipo I, confirmando de esta forma la función de barrera a la riboflavina que realiza el epitelio<sup>192</sup>. La necesidad de la desepitelización es un paso inicial en crosslinking que ha sido demostrado *in vitro* en ojos de porcino por otros investigadores ya que se revela que para que la riboflavina penetre a lo largo de todo el estroma corneal el epitelio debe estar totalmente erosionado<sup>177, 193</sup>.

La tinción amarilla intensa de la cámara anterior sirve como un rasgo de seguridad, ya que indica que la riboflavina ha penetrado totalmente la córnea y por tanto ésta está saturada<sup>192</sup>. En los casos en los que no se ha desepitelizado se observa una coloración amarillenta ligera o casi nula en la cámara anterior, lo que hace dudar de una córnea saturada de riboflavina y que esta pueda ejercer su función protectora<sup>192</sup>. No obstante son necesarios más estudios sobre la seguridad y la efectividad del método transepitelial<sup>181</sup>.

Cuando se produce la desepitelización en la córnea previa a la aplicación de la riboflavina, se obtienen imágenes (por medio de la utilización de la microscopía confocal) que muestran queratocitos muertos en la parte anterior del estroma y queratocitos sanos en la parte posterior<sup>192</sup>. La frontera que se marca entre estas dos capas es visible a la lámpara de hendidura, y se denomina línea de demarcación<sup>192</sup>.

Si se detectan queratocitos muertos puede deberse a la generación de radicales suficientes para causar la muerte de estas células y para la creación de nuevos enlaces en el estroma anterior<sup>192</sup>. Cuando no se desepiteliza la córnea, no se observan queratocitos muertos ni se aprecia una línea de demarcación con la lámpara de hendidura<sup>192</sup>. Los cálculos realizados sí muestran un aumento exponencial de la polimerización al aumentar la concentración de riboflavina en el estroma corneal<sup>192</sup>. Esto lleva a pensar que incluso en córneas con epitelio intacto pueden producirse reticulaciones, pero la cantidad de enlaces creados, y por consiguiente, el aumento de la rigidez corneal serán menores que con la técnica habitual, ya que la saturación del estroma con riboflavina es menor<sup>192</sup>.

Resultados parecidos a estos obtienen Baiocchi *et al*, en el año 2009, en un estudio en el que demuestran que las concentraciones de riboflavina incrementan con el tiempo de exposición sólo si el epitelio se retira<sup>190</sup>.

Recientemente, surge un nuevo protocolo usando una solución de riboflavina hipoosmolar (sin dextrano en su composición) que se ha desarrollado para el manejo de las córneas finas<sup>194</sup>. En el estudio desarrollado por Hafezi *et al*, la solución hipoosmolar consigue un incremento de grosor en las córneas delgadas, permitiendo de esta forma realizar el tratamiento crosslinking y detener la progresión del queratocono<sup>194</sup>. No obstante, cabe señalar que las córneas a tratar con este nuevo protocolo deben tener un mínimo de grosor estromal de 323  $\mu\text{m}$  dado que se registran fallos en el tratamiento crosslinking en casos de córneas extremadamente delgadas<sup>195</sup>. Otra opción a valorar es la posibilidad de que disminuya el efecto biomecánico de las córneas artificialmente engrosadas dada la bajada de concentración de las fibras de colágeno<sup>178</sup>. Raiskup *et al*, en el año 2011, informan de que un año después de la aplicación del tratamiento crosslinking con la riboflavina hipo-osmolar las córneas tratadas presentan estabilidad y mejoría en el espesor corneal<sup>196</sup>.

Una nueva tendencia en la aplicación de la riboflavina es la inyección intraestromal<sup>197</sup>. En el año 2012, Kiliç *et al* presentan una serie de 105 pacientes con historial de queratocono (131 ojos) en los que se realiza la creación de unos canales intraestromales con láser femtosegundo para la implantación de los ICRS<sup>197</sup>. Una vez realizados los canales, se procede en primer lugar a la inyección de la solución de riboflavina hasta que pase los 360° y posteriormente a la implantación de los anillos<sup>197</sup>. Una vez terminado este paso se procede a la aplicación de riboflavina en la superficie corneal y la aplicación de radiación UVA<sup>197</sup>. La combinación de crosslinking con implantación de ICRS añade rigidez y fuerza a la córnea y para la progresión de la enfermedad<sup>197</sup>. Los autores consideran que puede ser una técnica segura y efectiva dado que la inyección directa de la riboflavina en los canales produce una mayor penetración, puede

incrementar el efecto del crosslinking y producir menos *haze* en córnea central<sup>197</sup>.

Otra de las estrategias de administración de la solución de riboflavina es la utilización de láser femtosegundo para la creación de un bolsillo intraestromal para la administración de riboflavina<sup>198</sup>. Se realiza en 10 pacientes con ojos queratocónicos tempranos un bolsillo de 7 mm de diámetro a una profundidad de 100  $\mu\text{m}$  para la administración de la solución de riboflavina y se procede a la radiación de la superficie con unos parámetros de flujo alto (7  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) durante 15 minutos<sup>198</sup>. Se reduce el valor  $k$  máximo, no hay progresión de ectasia y no se presentan cambios significativos en el conteo de células endoteliales<sup>198</sup>. El grosor corneal está más delgado inicialmente pero vuelve al nivel preoperatorio los primeros 18 meses<sup>198</sup>. No se produce un efecto biomecánico negativo<sup>198</sup>.

En el año 2014, Wollensak *et al* presentan un estudio comparativo para evaluar el efecto biomecánico en córneas porcinas<sup>199</sup>. Se emplean 40 ojos divididos en 4 grupos: grupo 1 no recibe tratamiento, grupo 2 recibe el tratamiento crosslinking estándar, grupo 3 se realiza la técnica de bolsillo con láser femtosegundo y grupo 4 donde se realiza la técnica de bolsillo seguida de la aplicación de riboflavina<sup>199</sup>. El efecto biomecánico que se produce utilizando la técnica de bolsillo es aproximadamente el 50% menos pronunciado que el efecto que se produce con el crosslinking estándar. Se necesitan más estudios para mejorar ese escaso efecto biomecánico.

## Complicaciones del tratamiento

A pesar de que el grupo de investigadores de la Universidad de Dresden no describe ninguna complicación en sus trabajos, estudios realizados por Mazzota *et al* y por Kymionis *et al*, y otros grupos de trabajo, describen casos de queratitis lamelares difusas, queratitis herpéticas con iritis, endotelitis, cicatrices estromales, infiltrados estériles y una ligera opacidad de la córnea<sup>200-204</sup>.

Kymionis *et al*, en el año 2007, señalan que, a pesar de los esperanzadores resultados obtenidos hasta la fecha, el tratamiento crosslinking no es un procedimiento exento de riesgos y complicaciones<sup>200</sup>. Este grupo de trabajo describe una queratitis herpética tras la aplicación de la riboflavina/UVA en una córnea de la especie humana<sup>200</sup>. A raíz de estos se cree que la irradiación de la luz UVA es un potente estímulo que puede inducir la reactivación de infecciones herpéticas latentes incluso en pacientes que no han desarrollado historial clínico de infecciones por herpesvirus ocular<sup>200</sup>. Como causas de esta reactivación aparte de la irradiación también describe el trauma corneal de la desepitelización como factor de riesgo<sup>200</sup>.

Este mismo grupo de trabajo, describe también en ese año un caso de queratitis lamelar difusa (DLK) en un paciente de 27 años con una cirugía de LASIK practicada 4 años antes<sup>201</sup>. Al primer día post-crosslinking refiere una alta sensibilidad a la luz y al examen mediante lámpara de hendidura se detectan infiltrados inflamatorios periféricos<sup>201</sup>. Se postulan varios factores del crosslinking como desencadenantes de la DLK, tales como la retirada de epitelio y la luz UVA<sup>201</sup>. La retirada del epitelio puede conllevar a la producción de citoquinas que estimulan a los queratocitos a producir sustancias que atraen a las células inflamatorias causando esos infiltrados que se describen<sup>201</sup>.

Pérez-Santoja *et al* describen en el año 2009 un caso de una paciente de 29 años que ha sido tratada con riboflavina/UVA por un queratocono progresivo<sup>205</sup>. A los dos días de realizado el tratamiento se presenta con fotofobia, visión borrosa, nódulos blancos y defectos epiteliales<sup>205</sup>. Tras un raspado se aísla *Staphylococcus epidermidis* que responde al tratamiento médico de forma rápida con regresión de la inflamación y de los infiltrados<sup>205</sup>. A los 5 meses la paciente tiene un ligero haze y un grosor corneal de 405µm<sup>205</sup>. Los autores consideran que, dado que la córnea tarda de 2 a 5 días en curar completamente, la córnea comprometida ha sido el factor predisponente por una contaminación intraoperatoria o postoperatoria temprana<sup>205</sup>. En la misma línea, Arora *et al* presentan un caso de un paciente de 8 años con adelgazamiento central cor-

neal, grosor de 413µm y cicatrices estromales con historial de queratoconjuntivitis vernal (VKC)<sup>206</sup>. Se le aplica el tratamiento crosslinking y a las 24 horas se presenta una fotofobia severa acompañada de visión borrosa, infiltrado estromal y precipitados queráticos que se resuelven instaurando un tratamiento médico con corticoides<sup>206</sup>. Entre los factores que formulan los autores como predisponentes se encuentran la aplicación de antiinflamatorios tópicos, una respuesta variable a la luz UVA, sobre-exposición a la radiación, edad o queratoconjuntivitis vernal; siendo estos dos últimos los que ganan más peso<sup>206</sup>.

Mazzotta *et al*, por medio del uso de la microscopía confocal refieren dos casos de córneas queratocónicas en la especie humana a las que se les ha realizado el tratamiento crosslinking, y en las que se detecta un haze estromal durante el primer mes posterior a la aplicación de la riboflavina/UVA<sup>207</sup>. Este grupo de trabajo describe ese haze estromal como una hiperdensidad de la matriz extracelular con edema que conlleva la pérdida de visión del paciente<sup>207</sup>.

En otros estudios, se remarca la diferencia entre la aparición de un haze tras aplicación de PRK, de aparición estrictamente subepitelial<sup>208</sup>, y un haze post-crosslinking el cual se extiende en el estroma anterior a una profundidad de 300 µm (aproximadamente el 60%)<sup>144, 207, 209, 210</sup>. La naturaleza del haze post-crosslinking no está del todo determinada pero estos autores lo relacionan con la profundidad del tratamiento y la pérdida de queratocitos<sup>207, 211</sup>. En estudios *ex vivo*, Wollensak *et al* demuestran que la aplicación del crosslinking lleva consigo una inmediata pérdida de queratocitos en el estroma corneal<sup>150</sup> mientras que Mazzotta *et al* en el año 2007 detallan, con un estudio de microscopía confocal, que la repoblación de queratocitos se inicia a partir de los dos meses de aplicación del crosslinking siendo casi completa a los seis meses<sup>212</sup>. Es posible que esta activación de la población de queratocitos contribuya al desarrollo del haze asociado a crosslinking<sup>207, 212, 213</sup>.

Koller *et al* refieren un estudio realizado en 117

ojos de 99 pacientes con córneas queratocónicas en el que registra un ratio de fallo del 7.6% al año de seguimiento<sup>211</sup>. Los autores identifican que edades superiores a 35 años, grosores de córnea menores de 400  $\mu\text{m}$  y lectura queratométrica máxima de 58 D son factores de riesgo para posibles complicaciones del tratamiento crosslinking y señalan la importancia de respetar estos criterios de inclusión para reducir la tasa de complicación del crosslinking<sup>211</sup>. Unos criterios más exigentes son los que proponen Greenstein *et al* en el año 2013, tras un estudio en 104 ojos en los que se aplica el tratamiento crosslinking<sup>214</sup>. Una vez evaluados los efectos del tratamiento, seleccionan los criterios preoperatorios favorables a unos buenos resultados, siendo éstos: historial de progresión de queratocono, CDVA preoperatoria de 20/40 o peor, y valor k máximo de 55,0 D o más<sup>214</sup>. No obstante no hay factores preoperatorios que sean predictivos de un fallo del tratamiento crosslinking<sup>214</sup>.

En la bibliografía consultada sobre posibles complicaciones del tratamiento, Labiris *et al* refieren un caso de *melting* corneal posterior al tratamiento crosslinking en una córnea queratocónica asociado con una respuesta inflamatoria aguda<sup>215</sup>. En la revisión a las 24 horas se detecta en el ojo tratado una intensa fotofobia, enrojecimiento así como agudeza visual disminuida<sup>215</sup>. Refieren un severo *haze* acompañado de precipitados endoteliales y células inflamatorias en la cámara anterior<sup>215</sup>. La córnea presenta una lenta reepitelización y que resulta en un descemetocele que requiere una queratoplastia penetrante a los dos meses del tratamiento crosslinking<sup>215</sup>. Para intentar entender las causas de esta reacción los autores realizan pruebas de hipersensibilidad a la riboflavina así como cultivos para evaluar una posible contaminación, ambas pruebas tienen un resultado negativo, concluyendo el estudio sin encontrar las causas de la reacción de la córnea y señalando la importancia de realizar más estudios dirigidos a la seguridad del crosslinking sobre el tejido corneal<sup>215</sup>.

En los últimos años se empiezan a registrar casos de daño endotelial posterior a la aplicación del tratamiento crosslinking. Gokhale en el año

2011, publica un caso de daño endotelial severo tras la aplicación de riboflavina/UVA en un paciente de 37 años con queratocono progresivo y un grosor corneal de más de 400  $\mu\text{m}$ <sup>216</sup>. El paciente recibe el tratamiento estándar de crosslinking<sup>138</sup>, y presenta un edema corneal masivo al mes de su aplicación<sup>216</sup>. Se instaura un tratamiento médico de corticoides hasta que se resuelve el edema a los 6 meses post-crosslinking<sup>216</sup>. Se observa una cicatriz en forma de anillo y una disminución en el conteo de células endoteliales<sup>216</sup>. Este autor concluye en su estudio que el grosor corneal no es el único factor a tener en cuenta para prevenir el daño endotelial<sup>216</sup>.

En el año 2012, Bagga *et al* reportan un caso de un paciente de 18 años con queratocono progresivo en el ojo derecho que se ha sometido a un tratamiento crosslinking y a los 20 días presenta un edema de moderado a severo, precipitados queráticos pigmentados, un espesor de 514  $\mu\text{m}$  y la pupila dilatada y fija<sup>217</sup>. Descartan la presencia de herpesvirus dado que la PCR da negativa, se instaura un tratamiento médico de corticoides sin respuesta y se obtiene un conteo endotelial disminuido y un edema persistente que alcanza un grosor corneal de 1000  $\mu\text{m}$ <sup>217</sup>. A los 6 meses, el iris presenta parches atróficos, el edema corneal es severo, la pupila persiste dilatada, y se ha desarrollado una bulla epitelial<sup>217</sup>. Se deriva el paciente a la realización de una queratoplastia penetrante y la muestra se envía a histología<sup>217</sup>. En el corte histológico de la muestra se observa una pérdida generalizada de las células endoteliales<sup>217</sup>. Los autores plantean una serie de posibles factores que pueden haber hecho que este paciente presentase este daño endotelial como por ejemplo una sobreexposición a la radiación por emisor de luz UVA demasiado cercano a la superficie ocular, una poca focalización de la fuente de luz o incluso, una deshidratación de la córnea o adelgazamiento excesivo del espesor por la retirada del epitelio<sup>217</sup>. Consideran que es indispensable el estudio a largo plazo de sus efectos colaterales, para poder concretar los criterios de selección de los pacientes<sup>217</sup>.

Ese mismo año, 2008, Lange *et al* también publican un caso de afectación de endotelio corneal

en un paciente de 31 años con historia de queratocono progresivo bilateral tras la realización de riboflavina/crosslinking<sup>218</sup>. A las dos semanas de recibir el tratamiento el paciente presenta un *haze* en el estroma predescemético, que va evolucionando hasta los 3 meses presentando un edema y una cicatriz endotelial<sup>218</sup>. Tras no responder al tratamiento médico, a los 20 meses se remite a una queratoplastia penetrante dado el adelgazamiento corneal persistente, la cicatriz endotelial y la pérdida de visión<sup>218</sup>. Dado que no hay un conteo previo de células endoteliales los autores no pueden atribuir el daño endotelial al crosslinking; dado el grosor reducido (tras retirar 50µm de epitelio se queda con menos de 400µm), la localización posterior de la cicatriz y el reducido conteo endotelial consideran que puede deberse a una sobreexposición a la radiación aunque no descartan la presencia de una inflamación predescemética que también puede conllevar a una pérdida de células endoteliales<sup>218</sup>.

## Indicaciones del tratamiento

Derakhsan *et al* diseñan un estudio para evaluar la efectividad de este tratamiento de primera elección en 31 ojos de 22 pacientes con queratocono temprano<sup>219</sup>. Los resultados obtenidos recogen una mejora en la lectura de valores queratométricos en el 77% de los casos y un incremento significativo en la media del grosor corneal (9.1 +/- 11.2 µm)<sup>219</sup>. Esta mejora se inicia en el primer mes, incrementa ligeramente en el tercer mes postoperatorio y permanece estable al alcanzar el sexto mes de seguimiento postoperatorio<sup>219</sup>. Los autores confirman la necesidad de más estudios para establecer el tiempo adecuado de aplicación del tratamiento crosslinking, dado que los cambios producidos a medio plazo en pacientes con queratocono temprano son más leves que los obtenidos en pacientes con un queratocono más avanzado<sup>219</sup>. Para evaluar la efectividad de riboflavina/UVA, en casos avanzados de queratocono progresivo, Sloot *et al* aplican el tratamiento crosslinking a pacientes con queratocono de suave a moderado y a pacientes con queratocono avanzado para valorar los efectos a 6 y 12 meses<sup>220</sup>. En ambos grupos la

progresión se detiene en un 91% y disminuye la paquimetría corneal<sup>220</sup>. El mayor aplanamiento de la córnea se produce en el grupo de pacientes con queratocono avanzado, de esta forma la estabilización que produce el tratamiento es mayor (93%) en pacientes con queratocono en estadios más avanzados<sup>220</sup>. De forma contraria, Arora *et al*, en su estudio sobre la aplicación del tratamiento crosslinking en queratoconos tempranos ( $\leq 53$ ) y en avanzados ( $> 53$ ), consideran que el queratocono avanzado responde menos al efecto crosslinking, mientras que el queratocono temprano mejora significativamente a los 12 meses por aplanamiento de la curvatura<sup>221</sup>.

Como resultados a largo plazo, en un estudio retrospectivo (480 ojos de 272 pacientes) realizado por Raiskup-Wolf *et al*, detallan que el proceso de aplanamiento continúa durante un periodo de 6 años e informan de una detención de la progresión del queratocono así como una mejora en la agudeza visual<sup>124</sup>. La estabilización a largo plazo de las córneas queratocónicas post-crosslinking, sin efectos colaterales significantes, también es demostrada en un estudio de 44 ojos con un seguimiento de 48 meses realizado por Caporossi *et al*<sup>171</sup>. En la misma línea, en cuanto a estudios a largo plazo, Poli *et al* describen un estudio de 78 ojos en los que la mejoría en la agudeza visual a los 3 años junto con una detención de la ectasia hacen su consideración como tratamiento de primera elección<sup>222</sup>.

Uno de los temas más ampliamente discutidos sobre la aplicación del tratamiento crosslinking en queratocono es la edad del paciente. El diagnóstico de queratocono en edad pediátrica es un factor pronóstico negativo con un incremento de la probabilidad de necesitar un trasplante de córnea<sup>223</sup>. Concretamente, los pacientes jóvenes se consideran una población de alto riesgo por presentar una progresión más rápida de la enfermedad<sup>125, 223</sup>. Caporossi *et al*, en su estudio, realizan un análisis funcional del efecto del crosslinking en tres grupos de edad diferente ( $\leq 18$  años, entre 19-26 años y  $\geq 27$  años) de pacientes afectados por queratocono progresivo<sup>224</sup>. Un total de pacientes de edades comprendidas entre 10 y 40 años se someten a un tratamiento crosslinking (en total

516 ojos) siguiendo el protocolo de Siena<sup>145</sup>. Los resultados funcionales del grupo pediátrico son levemente mejores, pero sin diferencias significativas con respecto al grupo intermedio (19-26 años), mientras que el grupo  $\geq 27$  años muestra una respuesta positiva pero de baja calidad comparada con el resto<sup>224</sup>. La capacidad efectiva del tratamiento crosslinking es del 90% en los grupos correspondientes a edades menores de 26 años<sup>224</sup>. En pacientes de  $\geq 27$  años, la baja respuesta al tratamiento puede ser explicada por una plasticidad reducida del colágeno en la edad adulta, ya demostrado en la literatura<sup>29</sup>. El tratamiento crosslinking en  $> 35$  años puede resultar menos efectivo y con más fallos y complicaciones, como ya defendieron Koller *et al*<sup>11</sup>. Los autores concluyen que el tratamiento crosslinking sin la retirada de epitelio debería ser la primera elección en queratoconos progresivos en pacientes  $< 26$  años con al menos  $400\mu\text{m}$  en su punto más delgado<sup>224</sup>. En su estudio prospectivo de aplicación de tratamiento transepitelial con 22 pacientes queratocónicos de  $15,7 \pm 2,1$  de media de edad y  $\geq 400\mu\text{m}$ , Salman observa que se produce un aplanamiento por reducción del valor k apical a los 12 meses del tratamiento pero considera que puede ser poco tiempo para ver una posible reversión<sup>225</sup>.

Además de su utilización ampliamente descrita en el queratocono<sup>226, 227</sup>, el tratamiento crosslinking está siendo utilizado en la actualidad para otro tipo de queratectasias, las ectasias especiales (distrofia de Fuchs)<sup>228</sup>, degeneración marginal pelúcida<sup>229</sup>, queratopatía bullosa<sup>230, 231</sup> e incluso alteraciones de la córnea (úlceras)<sup>169</sup>.

Kymionis *et al* describen en el año 2009 la aplicación simultánea de PTK más tratamiento crosslinking en una paciente de 34 años con degeneración marginal pelúcida progresiva bilateral, que a los 12 meses de la aplicación del tratamiento presenta una mejoría en la agudeza visual de ambos ojos así como una mejora en la topografía corneal<sup>229</sup>. Dado el efecto antiedematoso sugerido por Wollensak *et al*, en el año 2007<sup>147</sup>, este mismo grupo de trabajo amplía la aplicación del tratamiento crosslinking a las queratopatías bullosas en un intento de reducir ese edema corneal

crónico característico<sup>230</sup>. En su estudio, una serie de 3 pacientes con queratopatía bullosa reciben riboflavina/UVA previa deshidratación con glucosa al 40%<sup>230</sup>. A lo largo de 8 meses disminuye el grosor corneal (una media de  $93 \pm 14,22\mu\text{m}$ ) e incrementa la transparencia, disminuyendo el dolor y disconfort<sup>230</sup>. Plantean el tratamiento crosslinking alternativo a otros como el trasplante de membrana amniótica, flap conjuntival o láser<sup>230</sup>. A pesar de que se necesitan más estudios a largo plazo, la teoría que sostienen es que los puentes intra e interfibrilares creados previenen o reducen el edema estromal en córnea anterior<sup>230</sup>. Kozobolis *et al*, describen 2 pacientes con queratopatía bullosa combinada con úlcera corneal que responden de igual forma que en el caso anterior, con mejoría de agudeza visual, disminución del disconfort ocular, así como del grosor estromal y opacidad, manteniendo la teoría de que este tratamiento debería ser considerado una herramienta adyuvante para tratar estas alteraciones, sobre todo en casos resistentes a la terapia tradicional<sup>231</sup>.

Posterior al estudio realizado por Kohlhaas *et al*<sup>143</sup>, se registra en la bibliografía un trabajo realizado por Hafezi *et al*, en el año 2007, para tratar la ectasia post-LASIK<sup>232</sup>. En este estudio, se aplica el tratamiento crosslinking a 10 pacientes con ectasia post-LASIK con unos parámetros de seguimiento tales como toma de imágenes mediante lámpara de hendidura, topografía corneal para evaluación de la superficie corneal, paquimetría para la toma de medidas del espesor corneal y tonometría entre otros<sup>232</sup>. Este grupo de trabajo también describe la aparición de un *haze* subepitelial, ya descrito en otros trabajos, que pasados los 12 primeros meses desaparece manteniéndose todas las córneas claras<sup>232</sup>.

Los resultados obtenidos de este trabajo demuestran que el tratamiento crosslinking puede parar la progresión de la queratectasia e incluso conseguir revertirla parcialmente dada la reducción de los valores del radio corneal como resultado del incremento de la estabilidad corneal al igual que en los casos de aplicación en el queratocono<sup>232</sup>. A los 12 meses de aplicación del tratamiento crosslinking la progresión de la queratectasia se

había detenido en 5 pacientes y había revertido parcialmente en los otros 5, lo cual convierte este procedimiento como un método viable para las ectasias postquirúrgicas a falta de estudios a largo plazo<sup>232</sup>. En el mismo sentido, en el año 2011, Salgado *et al* muestran una regresión de la ectasia corneal con aplanamiento de la córnea en una serie de 22 pacientes con ectasia post-LASIK a los 6 meses del tratamiento crosslinking<sup>203</sup>. Li *et al*, en el año 2012, también se suman a la teoría de que puede estabilizar o parcialmente revertir la progresión inducida por el LASIK sin complicación aparente<sup>233</sup>. En sus resultados a los 12 meses de aplicación del tratamiento, los pacientes mantienen una mejoría visual y presentan las córneas claras (8 de 20 ojos presentan *haze* postoperatorio)<sup>233</sup>.

En el ámbito de las queratectasias especiales, a mediados del 2010, Hafezi *et al*, plantean un estudio sobre la posibilidad de obtener beneficios con la aplicación del tratamiento crosslinking en la distrofia de Fuchs con varios grados de edema corneal y variaciones en la agudeza visual<sup>228</sup>. En este trabajo se utiliza una forma modificada del tratamiento en el cual la solución de riboflavina no posee dextrano al 20 % si no glicerol al 70 %, y durante la irradiación se toman medidas del espesor central corneal<sup>228</sup>. La utilización del glicerol en vez del dextrano se explica para lograr una mayor reducción del espesor corneal por deshidratación para conseguir el mayor efecto cerca del endotelio<sup>228</sup>. Con resultados favorables puede que este tratamiento no prevenga los resultados de la distrofia, pero al menos puede incrementar el confort visual del paciente hasta que se haga necesaria una queratoplastia<sup>228</sup>.

Abriendo nuevos campos, Wollensak *et al* refieren un estudio experimental realizado en 6 animales de la especie cunicula en donde se aplica el crosslinking en un área escleral del cuadrante superior<sup>234</sup>. Las muestras de la esclera tratada de un área de 4x10 mm se colocan en un probador de biomateriales para medir la variación de la tensión<sup>234</sup>. En los resultados obtenidos no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el grosor pre y postoperatorio así como un incremento de la tensión del 228%<sup>234</sup>. Wollensak *et al* concluyen

que la formación de nuevos enlaces en la esclera puede ser un tratamiento efectivo para la miopía progresiva<sup>234</sup>. Otro estudio dirigido en este sentido, del mismo grupo de trabajo, utiliza 9 conejos en los que se aplica en la esclera una solución de riboflavina sin dextrano más la radiación UVA<sup>235</sup>. Se realiza un sacrificio humanitario de los animales a diferentes tiempos (3 días, 4 y 8 meses) y se procede a su evaluación<sup>235</sup>. Histológicamente no se observa una diferencia significativa en el grosor respecto al ojo contralateral (utilizado como control), ni alteraciones microscópicas ni signos de inflamación en el epitelio sensorial o pigmentario de la retina<sup>235</sup>. Las medidas de tensión y estrés realizadas con el testador de biomateriales revelan un incremento de la rigidez biomecánica que permanece hasta los 8 meses (final de estudio), lo que lleva a valorar este tratamiento como posible aplicación para el tratamiento de miopía, como ya sugieren en su anterior estudio<sup>235</sup>.

Otras posibles aplicaciones en un futuro del tratamiento crosslinking, que están en plena fase de estudio, son los casos de miopía leve, combinando tratamiento crosslinking con LASIK o con TKP<sup>236</sup>. Kampik *et al* han trabajado con ojos enucleados de porcino previamente tratados con crosslinking y los resultados posteriores del LASIK muestran una disminución del cambio refractivo y un incremento del grosor del flap<sup>236</sup>. No obstante son necesarios más estudios para determinar si la asociación del CxL y LASIK puede reducir los riesgos de padecer una ectasia postquirúrgica<sup>236</sup>.

Kanellopoulos plantea en su estudio un aumento en el flujo de radiación (10mW/cm<sup>2</sup>) y una disminución en el tiempo de aplicación de la misma (3 minutos), en 23 pacientes que se someten a una cirugía LASIK con un flap de profundidad de 110µm<sup>237</sup>. Posterior a la realización del flap se empapa el estroma corneal con la solución de riboflavina y se reposiciona el flap para empezar la aplicación de la radiación<sup>237</sup>. Se consigue una mejora en la agudeza visual así como una reducción de la queratometría corneal y del grosor<sup>237</sup>. A los 3,5±1,6 años ningún paciente ha desarrollado ectasia postquirúrgica<sup>237</sup>. Dado que el LASIK para hipermetropía puede producir un adelgazamiento

progresivo de fibras y este hecho se minimiza con crosslinking, se puede usar este efecto para modular la regresión a lo largo del tiempo<sup>238</sup>. Ese mismo año, también presentan su estudio Celik *et al*, en el cual comparan el uso de LASIK frente al uso de LASIK + crosslinking acelerado (reduciendo el tiempo de exposición a 3 minutos y manteniendo la misma dosis de radiación)<sup>239</sup>. El grosor permanece estable en ambos grupos, no se observan cambios en la queratometría ni pérdida de células endoteliales<sup>239</sup>. A falta de más estudios, los autores creen que puede ser un buen método para estabilizar la refracción del paciente<sup>239</sup>.

Siguiendo con el abanico de posibilidades que puede abarcar el tratamiento crosslinking, el grupo de trabajo de Anwar *et al* presenta, en el 2011, dos casos de pacientes con queratitis infecciosa que no responde a tratamiento antimicrobiano<sup>240</sup>. En uno de los casos, a la semana de la aplicación del crosslinking, el absceso corneal reduce su diámetro en 2 mm y el paciente refiere menos sensación de dolor<sup>240</sup>. A las dos semanas post-cirugía, tanto el absceso como el epitelio están completamente resueltos, aunque permanece una cicatriz corneal<sup>240</sup>. En el otro caso que se presenta, a la semana de la aplicación de crosslinking, el absceso muestra los márgenes definidos y menos infiltración que en el preoperatorio<sup>240</sup>. En el seguimiento a los dos meses, refieren la desaparición del absceso sustituido por una cicatriz corneal estromal profunda que se resuelve 4 meses después con una queratoplastia penetrante<sup>240</sup>. Los autores sugieren una doble aplicación del crosslinking, por un lado la capacidad de destruir microorganismos patógenos en la córnea, ya que disminuye la susceptibilidad de la córnea a las enzimas proteolíticas<sup>146</sup>, y por otro lado, evitar la urgencia de una queratoplastia penetrante con el elevado riesgo de rechazo del injerto que conlleva<sup>240</sup>.

En este sentido, en el año 2012, Makdoui *et al* publican los resultados de un estudio en el que tratan mediante crosslinking corneal a 16 pacientes con un diagnóstico clínico de queratitis infecciosa sin tratamiento previo<sup>241</sup>. Todas las córneas tratadas responden al tratamiento crosslinking con una mejoría en los síntomas y

una reducción de la inflamación, consiguiéndose la cicatrización epitelial en todos los casos salvo en uno de los pacientes requiere un trasplante de membrana amniótica<sup>241</sup>. Este mismo año, Abbouda *et al*, presentan dos casos de queratitis fúngica con presencia de *melting* que no responden al tratamiento médico y se someten a tratamiento crosslinking estándar<sup>242</sup>. Mediante OCT se evalúa la profundidad preoperatoria y la extensión de los infiltrados así como las posibles modificaciones durante el seguimiento. Uno de los casos pese al crosslinking presenta perforación corneal<sup>242</sup>. Los autores consideran que evaluar la extensión y la profundidad de la inflamación puede explicar los diferentes resultados post-crosslinking<sup>242</sup>.

En el año 2008, Iseli *et al*, refieren un estudio de cinco pacientes a los que se le aplica el tratamiento crosslinking en córneas *melting* debido a queratitis infecciosa<sup>243</sup>. El *melting* se detiene en todos los casos, sin que ninguno requiera una queratoplastia de emergencia<sup>243</sup>. En este sentido, en el año 2012, Gao *et al* diseñan un estudio con 20 conejos de la raza Neozelandesa cuyos resultados confirman que el tratamiento crosslinking no sólo puede prevenir y retrasar el *melting* corneal posterior a una quemadura álcali sino que también puede reducir la destrucción de las fibras de colágeno de la córnea y la infiltración de células inflamatorias en el tejido corneal<sup>244</sup>. En la misma línea de utilización del tratamiento como terapia coadyuvante, Said *et al* describen este mismo año un estudio comparativo para evaluar la eficacia y la seguridad del crosslinking corneal, con el uso de riboflavina fotoactivada con un cromóforo, para queratitis infecciosa en el manejo de *melting* corneal<sup>245</sup>. En su estudio utilizan 40 pacientes con queratitis infecciosa avanzada con *melting* corneal, y los dividen en dos grupos, un grupo de 21 pacientes (21 ojos), que recibe el tratamiento de crosslinking más terapia antimicrobiana, y un grupo de 19 pacientes (19 ojos) que sólo recibe la terapia antimicrobiana<sup>245</sup>. El tratamiento propuesto no acorta el tiempo de cicatrización corneal, pero sí reduce la tasa de complicaciones dado que no presenta ni perforación ni recurrencia de la queratitis, mientras que el grupo control sufre una tasa de complicaciones del 21%<sup>245</sup>.

Aunque el tratamiento crosslinking ha demostrado ser eficaz en enlentecer e incluso parar la progresión del queratocono, la recuperación visual, aunque estadísticamente significativa, es bastante modesta<sup>246</sup>. Como resultado, se están empezando a desarrollar nuevas líneas de trabajo que combinan la aplicación del tratamiento crosslinking con otras técnicas queratorefractivas para mejorar la visión<sup>246</sup>. Estas técnicas incluyen queratectomía radial, queratectomía fotorefractiva (PRK), queratotomía asimétrica, LASIK, queratoplastia lamelar y epikeratoplastia<sup>246</sup>, entre otras. Desafortunadamente, en los estudios realizados hasta la fecha se demuestra que muchas de estas alternativas tienen pobre predictibilidad refractiva y pobre estabilidad<sup>246</sup>.

En la bibliografía consultada en la temática de la combinación de los tratamientos actuales, Calossi *et al* presentan un estudio prospectivo de 4 pacientes (5 ojos) con queratocono, intolerancia a las lentes de contacto convencionales y con una taquimetría corneal  $>400\mu\text{m}$ <sup>247</sup>. Los pacientes se someten a un tratamiento ortoqueratológico (OK) durante 3 meses y, transcurrido este periodo se les aplica el tratamiento crosslinking<sup>247</sup>, siguiendo el protocolo de Siena<sup>145</sup>. Tras un mes se vuelve a reanudar el tratamiento ortoqueratológico durante 15 semanas<sup>247</sup>. En todos los casos, las topografías obtenidas demuestran una mejora en la forma corneal después de la realización de la ortoqueratología (OK), con una importante reducción de la aberración corneal, que vuelve a sus niveles previos un mes después de la retirada de la OK<sup>247</sup>. Un año después de la realización del tratamiento crosslinking se observa una reducción del astigmatismo, aunque las mejoras en agudeza visual se reducen 4 meses después de la aplicación del tratamiento crosslinking, sin llegar a los niveles previos a la aplicación de OK<sup>247</sup>. La aplicación de riboflavina/ultravioleta parece un tratamiento seguro pero no es capaz de estabilizar el efecto moldeador de las lentes de ortoqueratología<sup>247</sup>.

En la misma línea que los estudios de Kymionis *et al*, en el año 2011, sobre la combinación de PRK con crosslinking<sup>131</sup>, Kanellopoulos describe un caso de un paciente de 57 años con una cicatriz

corneal por un trauma anterior que presenta ceguera corneal severa<sup>248</sup>. Se realiza una PRK seguida de la aplicación del crosslinking (siguiendo el protocolo de Atenas)<sup>148, 149, 249</sup>. A los 12 meses se observa en la OCT una reducción significativa de la cicatriz corneal, la superficie estromal más estable, el epitelio corneal más uniforme y el grosor corneal total se había reducido<sup>248</sup>. A los 15 meses se aprecia una córnea totalmente transparente<sup>248</sup>. El autor ratifica el uso de la PRK previa para producir una normalización de la superficie irregular previa a la aplicación del crosslinking, considerando esta combinación como una posible alternativa al uso de la queratoplastia lamelar o penetrante<sup>248</sup>.

Una de las aplicaciones de la combinación de PRK con tratamiento crosslinking es la ectasia post-LASIK según Kymionis *et al*, en su estudio sobre un paciente con queratectasia complicada con infección atípica micobacteriana<sup>250</sup>. Describen un caso de un paciente de 23 años que al mes de la aplicación de LASIK presenta una severa queratitis, congestión y presencia de infiltrados en la interfaz, así como un edema corneal<sup>250</sup>. No responde a tratamiento médico y se instaura un *melting* corneal<sup>250</sup>. Se realiza una amputación del flap, dado que está muy afectado por el *melting* y se realiza una combinación de PRK con tratamiento crosslinking estándar<sup>250</sup>. El *melting* empieza a revertir, a los 5 días se consigue una reepitelización completa y a la semana los infiltrados y el edema corneal se resuelven<sup>250</sup>.

En la literatura consultada también se describen casos de la aplicación de la combinación de PRK-crosslinking en pacientes con queratocono a los que se les ha implantado anillos intraestromales<sup>251</sup>. Kremer *et al* presentan un estudio de 40 pacientes (45 ojos) a los cuales 6 meses después de la implantación de los ICRS y una vez que está estabilizado el queratocono, se les aplica la combinación de PRK-crosslinking<sup>251</sup>. Posterior a la aplicación de esta combinación se observa sobre todo a lo largo de los canales un *haze* moderado, que remite a las 12 semanas<sup>251</sup>. Se produce una disminución de los valores k y de la paquimetría por lo que se considera, a falta de más estudios, una posible técnica segura y efectiva para la esta-

bilización del queratocono<sup>251</sup>, obteniendo la misma conclusión Çakir *et al* en sus estudios<sup>252</sup>. En el año 2012, y en la misma dirección que Kremer *et al*<sup>251</sup>, Yeung *et al* evalúan el efecto de la combinación de PTK-crosslinking-aplicación de ICRS en el mismo día con la hipótesis de conseguir un efecto aditivo, buscando una mayor estabilidad y mejoría en la función visual<sup>253</sup>. A los 6 meses de la aplicación de los tratamientos se consigue una mejoría en la agudeza visual, una mejora topográfica y un mayor aplanamiento corneal por reducción de los valores  $k$ <sup>253</sup>. Destacan la ausencia de complicaciones postoperatorias o la presencia de *haze*<sup>253</sup>.

Aslanides *et al*, en el año 2013, realizan un estudio de 5 ojos hipermétropes en el que combinan la aplicación de LASIK de forma simultánea con crosslinking para evaluar los resultados a largo plazo (4 años), así como su seguridad, estabilidad y eficacia<sup>254</sup>. Una vez realizada la ablación corneal, se deposita la solución de riboflavina directamente en el estroma corneal hasta su completa imbibición, posteriormente se reposiciona el flap y se procede a humedecer la superficie corneal con solución de riboflavina seguido de

aplicación de radiación<sup>254</sup>. Todos los ojos tratados con LASIK-crosslinking muestran estabilidad a lo largo del seguimiento sin aparente regresión, mientras que en el grupo de LASIK, que no ha recibido crosslinking, se observa una tendencia a la regresión hipermetrope<sup>254</sup>. De igual forma, se alcanzan los mismos niveles de agudeza visual que cuando se aplica LASIK sólo<sup>254</sup>. Los autores consideran que son escasos los casos para proporcionar conclusiones pero no observan regresión a los 4 años en el grupo tratado con la combinación (LASIK-crosslinking)<sup>254</sup>.

En último lugar, cabe destacar el trabajo realizado por Ahearne *et al* en el que describen la creación de hidrogeles similares al colágeno que, aunque presente menos fuerza mecánica que el tejido corneal real, es una opción atractiva frente al uso real del tejido en experimentos y su escasa disponibilidad y con gran utilidad para el mejor estudio y desarrollo del tratamiento crosslinking<sup>255</sup>.

Se observa un sumatorio general de las indicaciones en la Tabla 2.

<b>Parámetros del tratamiento crosslinking estándar</b>	
<b>Fotosensibilizante</b>	Solución riboflavina 0,1% (10 mg riboflavina-5-fosfato en 10 ml solución dextrano T500 al 20%)
<b>Tipo de radiación</b>	Luz Ultravioleta tipo A
<b>Longitud de onda</b>	370 nm
<b>Energía de radiación</b>	3mW/cm <sup>2</sup> (5,4 J/cm <sup>2</sup> )
<b>Distancia emisor (respecto al ojo)</b>	1 cm
<b>Duración</b>	30 minutos

Tabla 1. Parámetros descritos por Wollensak et al<sup>138</sup>.

<b>Indicaciones del tratamiento crosslinking</b>	
<b>Querectasias progresivas</b>	Queratocono Degeneración Marginal Pelúcida
<b>Querectasias iatrogénicas</b>	Lasik Queratotomía refractiva Queratoplastias (lamelares o penetrantes)
<b>Úlceras corneales</b>	Melting
<b>Asociación de técnicas</b>	Segmentos intracorneales Ortoqueratología Queratoplastia conductiva Lasik
<b>Queratitis</b>	Infecciosas Víricas Fúngicas
<b>Especiales</b>	Queratomalacia Distrofia de Fuchs Queratopatía Bullosa

Tabla 2. Sumatorio de indicaciones generales.



## III. Material y Métodos

La fase experimental del estudio se ha llevado a cabo en las instalaciones del Centro de Cirugía de Mínima Invasión “Jesús Usón” (CCMIJU) que está acreditado como Centro Usuario y de Cría de Animales de Experimentación (CC-001) por la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, de la Junta de Extremadura. Este trabajo se llevó a cabo siguiendo la normativa correspondiente a la Directiva del Europea 2010/63/UE y el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero de 2013 (B.O.E. nº34 del 8 de febrero) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

El protocolo experimental de este proyecto de investigación ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) del CCMIJU. El estudio se realizó siguiendo las normativas establecidas en la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, USA)*.

### MATERIAL

#### *Sujetos de estudio*

Para el presente estudio se emplearon 35 machos de la especie cunícula (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Neozelandesa, con un peso medio inicial de  $4 \pm 0.5$  kg. Tras su llegada al CCMIJU, los animales se mantuvieron aislados durante un periodo de aclimatación de dos semanas, y fueron sometidos a los correspondientes estudios sanitarios para acreditar el correcto estado de salud.

Se realizaron extracciones de sangre a cada animal para efectuar controles hematológicos y bioquímicos y verificar así que los valores obtenidos permanecían dentro de los niveles considerados

normales en la especie cunícula.

Una vez superado el periodo de aclimatación, los animales fueron identificados con microchip subcutáneo implantado en el lado izquierdo del cuello. Los animales fueron estabulados en el animalario del CCMIJU con las siguientes condiciones ambientales:

1. Jaulas individuales con cubeta de polisulfono con una superficie de 3m<sup>2</sup> y 40 cm de altura y un lecho de virutas de madera. Dichas jaulas están identificadas con el código del proyecto y con el número de identificación del animal.
2. Temperatura ambiental de 20-24 °C.
3. Humedad relativa 55%.
4. Quince renovaciones de aire por hora.
5. Ciclos de 12h de luz/oscuridad con control de la intensidad.
6. Pienso comercial para conejos (pienso completo de mantenimiento 2030 Teklad Global Rabbit Diet®, Harlan).
7. Agua de bebida osmotizada, administrada mediante un dispensador automático. Disponen de agua ad libitum.

Una vez realizada la cirugía los animales se clasifican al azar en diferentes grupos en función de la duración del estudio:

- Grupo A: postoperatorio.
- Grupo B: 3 días.
- Grupo C: 15 días.
- Grupo D: 1 mes.
- Grupo E: 3 meses.
- Grupo F: 6 meses.
- Grupo G: 18 meses.

## Material Anestésico, Quirúrgico y de Diagnóstico

Para la ejecución de este trabajo se utilizó el material anestésico necesario para llevar a cabo la premedicación, inducción y mantenimiento de los animales. En los procedimientos quirúrgicos se empleó instrumental específico de oftalmología.

Para el desarrollo del estudio se dispuso de un queratómetro automático portátil KM-500 (Nidek®) (Fig. 1) y de un topógrafo corneal Eye Top 2005® V.1.0 (CSO) (Fig. 2).



Fig. 1. Queratómetro automático portátil.



Fig. 2. Topógrafo corneal.

## MÉTODO

### Justificación del método

Con este trabajo experimental pretendemos evaluar la utilidad y la efectividad del tratamiento crosslinking. Este estudio se planteó como consecuencia del análisis de los resultados obtenidos en un estudio previo realizado por nuestro grupo, en el que se evaluó la efectividad de la asociación de dos técnicas moldeadoras de la superficie corneal como son los anillos intracorneales (Intacs®) y el procedimiento crosslinking. Las conclusiones obtenidas en dicho estudio, que coinciden con los trabajos publicados hasta el momento sobre el tema, nos han llevado a analizar en mayor profundidad los efectos provocados por este tratamiento a largo plazo y a realizar un seguimiento durante el periodo de estudio.

El desarrollo y la aplicación del procedimiento crosslinking ha supuesto una revolución en el mundo del tratamiento de las ectasias corneales debido a su reducido riesgo en comparación con los tratamientos existentes hasta la actualidad. Procedimientos quirúrgicos como la queratoplastia (tanto lamelar como penetrante) o la aplicación de anillos intracorneales comportan más riesgo y una mayor aparición de complicaciones postquirúrgicas debido al tipo de cirugía más agresiva y a los cuidados posteriores, así como la posibilidad de rechazo del trasplante corneal en caso de las queratoplastias.

Comprobados los efectos inmediatos y a medio plazo de esta nueva técnica, en la bibliografía consultada y tras los resultados obtenidos en nuestro estudio previo, diseñamos este estudio de cara a evaluar y estudiar los cambios morfológicos, topográficos e histológicos producidos en el estroma corneal a largo plazo.

Para la realización de este estudio se ha elegido la especie cunicula como modelo animal por su semejanza con la especie humana tanto en las características histológicas de las capas corneales

como en el espesor del estroma corneal. Tras realizar la revisión bibliográfica observamos que las especies utilizadas para estudios de oftalmología, concretamente de córnea, son la especie porcina y la cunícula.

La especie porcina posee similitudes en estructura y constitución con la especie humana excepto en el grosor corneal. En los estudios encontrados en ojo de cerdo, el efecto biomecánico del tratamiento crosslinking es menor que en el ojo humano por su diferencia en el espesor corneal. El efecto biomecánico que produce esta técnica en la córnea se ha medido usando equipos de tensión y estrés de biomateriales y muestra unos resultados de 328,9 % en córneas humanas y un 71,9 % en córneas de cerdo. El hecho de que se produzca un mayor efecto biomecánico en córneas humanas se debe a que el entrecruzamiento que produce el procedimiento crosslinking es máximo sólo en los 300  $\mu\text{m}$  anteriores y las córneas humanas tienen un espesor de 550  $\mu\text{m}$ , frente a las córneas porcinas que poseen un espesor de 850  $\mu\text{m}$ . El valor del espesor corneal es importante destacarlo dado que es uno de los indicadores de riesgo para la producción de una ectasia corneal. Dada la diferencia de grosor corneal entre la especie humana y la especie porcina, esta última se considera de segunda elección como modelo para estudios de oftalmología dado que no sería real a la hora de evaluar el reforzamiento de las fibras de colágeno al poseer más cantidad de láminas paralelas.

Los estudios en ojo de conejo han evidenciado que las similitudes con la córnea humana son mayores que en el caso del ojo de cerdo. La córnea del conejo posee un espesor estromal similar al de la córnea humana (450-500  $\mu\text{m}$ ) y el epitelio corneal guarda más similitudes con el ojo humano (en espesor y capas de células), de tal forma que lo consideramos ideal para la extrapolación a la especie humana. Su uso está condicionado a dos factores, la ausencia de membrana de Bowman en la especie cunícula y la rapidez en regeneración. La falta de la capa de Bowman no conlleva consecuencias en la regeneración epitelial ni altera el tiempo de la misma. Sin embargo, la mayor rapidez en regeneración y cicatrización de la córnea de

los conejos hacen necesaria una conversión real a humana una vez finalizado el estudio.

A pesar de dichas semejanzas hay que tener en cuenta las diferencias estructurales de la córnea sana con la córnea con queratocono. La córnea sana posee la arquitectura correcta, con paralelismo entre las fibras de colágeno y curvatura adecuada. Es una córnea con un grosor mayor que la córnea queratocónica y con mayor rigidez. La córnea queratocónica posee un adelgazamiento acentuado y un exceso de curvatura que conlleva la formación de un cono normalmente en la zona inferotemporal o apical.

La luz ultravioleta (UV) representa en general un daño potencial para el ojo por el daño fotoquímico que resulta en quemaduras solares o fotoqueratitis. Estas alteraciones se deben a la luz UV de tipo B (290-320 nm), principalmente absorbida por el epitelio corneal, que es la causante de mutaciones, de ahí la elección de luz UV de tipo A.

Utilizamos para los seguimientos (control y evaluación del estado de la córnea) técnicas no invasivas como son el queratómetro portátil y el topógrafo corneal.

Con la queratometría determinamos la curvatura corneal promedio de una zona a 3 mm de la córnea central. Se obtienen dos medidas correspondientes al meridiano horizontal y vertical de la córnea. El queratómetro expresa los resultados en milímetros de radio de curvatura o en dioptrías (dándonos la potencia corneal). Obtenemos la potencia corneal a través de la medición del radio de curvatura de la superficie anterior de la córnea de forma no agresiva para la córnea. Es un método rápido y sencillo para el cálculo de la potencia corneal y la evaluación para el cálculo de la adaptación de lentes intraoculares.

La topografía es altamente sensitiva y mediante su uso podemos evaluar la superficie corneal completa de manera computerizada obteniendo mapas a color de las diferentes zonas de la córnea con su respectiva curvatura, valorando posibles irregu-

laridades de la superficie anterior o posterior. De esta forma descartamos enfermedades que alteran la forma correcta de la córnea, diversos tipos de astigmatismo, para el estudio pre y post-quirúrgico de cirugías refractivas, trasplantes de córnea, etc. Junto con el uso de la queratometría obtenemos los datos necesarios para evaluar el estado corneal.

La elección de los tiempos de seguimiento posteriores al tratamiento crosslinking se fundamenta en los datos publicados previamente. En la bibliografía revisada se indica que a partir de los tres meses apenas se muestran cambios significativos importantes en el epitelio corneal que se puedan evidenciar con la queratometría y la topografía corneal. El criterio de elección para mantener un grupo de 18 meses se debe a la falta de estudios centrados en las consecuencias a largo plazo de la aplicación de radicación ultravioleta en la córnea.

Dado que es un tratamiento moldeador de la superficie corneal deben analizarse los efectos a nivel de las láminas de colágeno y su cicatrización correcta, la cual, no sólo conlleva la transparencia corneal sino también la ausencia de errores refractivos, mejora del perfil corneal e incremento de su resistencia.

Se establecen seguimientos cada 3 meses en el grupo de animales a largo plazo (18 meses) para evaluar cualquier modificación en la córnea o posible alteración ajena a nuestro estudio. Los seguimientos no se establecen con más frecuencia para evitar el estrés en los animales y porque se consideran suficientes las evaluaciones cada 3 meses dado que la córnea se ha estabilizado.

Los animales son intervenidos por el mismo equipo quirúrgico, estabulados en jaulas individuales en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión "Jesús Usón" (CCMIJU) y se les ha realizado un seguimiento máximo de 18 meses de evolución, periodo que pensamos puede representar fehacientemente resultados a largo plazo.

## PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Una vez superado el periodo de aclimatación y antes de iniciar cada procedimiento, los animales fueron sometidos a un estudio completo de diagnóstico oftalmológico para excluir cualquier patología oftálmica previa como úlceras, ectasias congénitas u opacidades corneales previas. Se adjunta un esquema de trabajo al final de este apartado (pág. 45).

### *Protocolo Anestésico*

Tras la realización de un examen clínico completo, se colocó un catéter intravenoso en la vena marginal de la oreja.

Los conejos fueron premedicados mediante la administración de medetomidina 1,0 mg (Domtor®, Pfizer) y ketamina (Ketolar® 50) (10 mg/kg). Tras la premedicación, preoxigenamos mediante una mascarilla facial (máscara de Hall) durante 5 minutos con oxígeno al 100 % con un flujo de gas fresco de 3-5 l/min. La anestesia fue inducida con propofol (Diprivan®, Zeneca) (4mg/kg) vía intravenosa.

Se procedió a intubar a los animales, mediante la técnica ciega, con tubos endotraqueales nº 3.0 con neumotaponamiento. Se conectó el tubo a un circuito circular semicerrado unido a un ventilador (Ohmeda) con un flujo de gases frescos de 0,3 l/min los cinco primeros minutos y pasado este tiempo se fijó en 1 l/min. El mantenimiento anestésico se realizó mediante anestesia inhalatoria con sevoflurano (Sevorane®, Abbott) a una concentración fijada en el vaporizador del 1,2-1,1%.

Durante toda la intervención quirúrgica se estuvo administrando infusión continua de Lactato de Ringer (Ringer Lactato®, Braun)(5-10 mg/kg) a través de la vena marginal de la oreja. Para

la relajación muscular necesaria se administró Vecuronio (Norcuron®) (0, 25 mg/kg) en bolus cada 50 minutos.

La analgesia se basó en la administración de buprenorfina (Buprex®) (10 µgr/kg) por vía subcutánea.

### *Cuidados Postoperatorios*

Posterior a cada intervención los animales fueron sometidos a una antibioterapia tópica con colirio de gentamicina (Colircusí Gentamicina®, Alcon Cusí) durante cinco días administrado 3 veces al día. Se les administró colirio de atropina 1% (Colircusí Atropina®, Alcon Cusí) cinco minutos antes de cada aplicación del colirio antibiótico.

Como analgesia post-quirúrgica se administra 0,5 ml Buprenorfina (Buprex®) (10 µg/kg) cada 12 horas durante 3 días.

### *Protocolo Quirúrgico*

Antes de iniciar la intervención se procedió al rasurado y desinfección de la zona periocular. Los animales se trasladaron a quirófano y se procedió a preparar el campo quirúrgico según el procedimiento habitual (antisepsia cutánea y colocación de paños estériles fenestrados para el abordaje de toda la zona orbitaria y globo ocular).

Se colocó a los animales en decúbito lateral izquierdo y se les realizó un lavado de la superficie ocular del ojo derecho con suero salino fisiológico (SSF, Braun®). Se realizaron tres queratometrías seriadas para la obtención de la media del radio de la superficie anterior de la córnea y su potencia en dioptrías con el queratómetro automático portátil KM-500 (Nidek®).

De igual forma se procedió a la toma de imágenes de la superficie corneal y el estado de su curvatura mediante la topografía corneal (topógrafo

corneal Eye Top® 2005 V.1.0 (CSO)).

Una vez tomados estos datos en el ojo derecho realizamos la misma maniobra en el ojo izquierdo colocando al animal en decúbito lateral derecho.

Seguidamente, se volvió a colocar al animal en decúbito lateral izquierdo para la cirugía. Se procedió a la debridación superficial de la córnea del ojo derecho (OD) mediante la utilización de un cuchillete oftálmico de 15° (Maní®, Bloss Group S. A.) en un área de 49 mm<sup>2</sup> (Fig. 3). Posteriormente se realiza un lavado de la superficie de la córnea con suero salino fisiológico (SSF, Braun®)

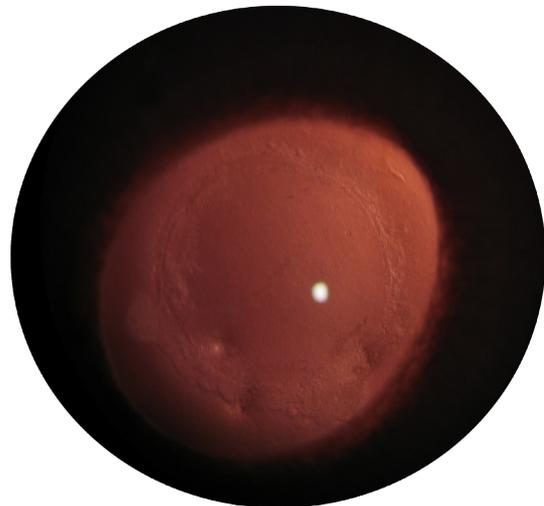


Fig. 3. Aspecto de la úlcera corneal.

y una limpieza con lancetas de celulosa de los restos debridados. Se practica la misma cirugía en el ojo izquierdo.

Una vez realizada la técnica quirúrgica se aplica el tratamiento crosslinking. En el OD se instilan dos gotas de la solución de riboflavina 0,1% (Ricrolin®, Sooft Italia), y esperamos 15 minutos para que se absorba la solución aplicada y se coloca la fuente de luz adecuada de radiación ultravioleta tipo A (UV-A (dispositivo experimental emisor de radiación ultravioleta de Oftaltech S.A, validado y calibrado en Universidad Politécnica de Cataluña; 8 LED's; radiación UVA 370±10 nm; potencia 3mW/cm<sup>2</sup>) a 2cm de distancia durante 30 minutos ininterrumpidamente (Fig. 4). Durante este periodo, se instilan dos gotas de riboflavina

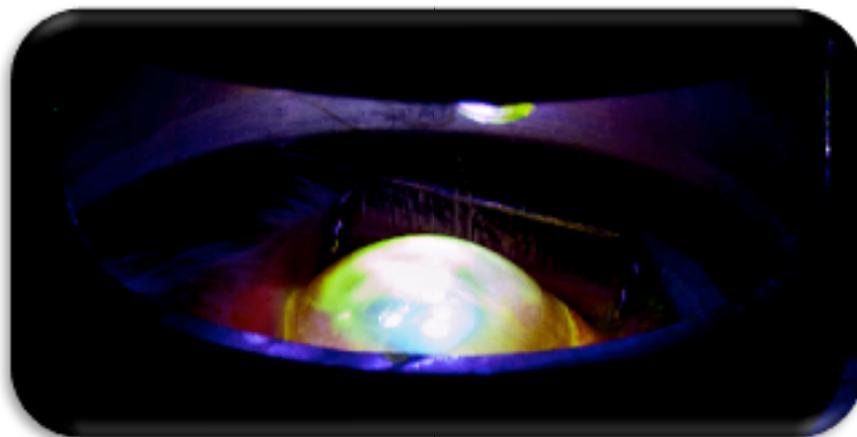


Fig. 4. Imagen de la córnea humedecida con la riboflavina recibiendo luz ultravioleta A.

cada 5 minutos.

Una vez recibido el tiempo de radiación establecido, se realiza un lavado de la superficie ocular con suero salino fisiológico (SSF, Braun®) para eliminar cualquier resto adherido a la córnea.

Durante todo el tiempo de radiación del OD, se instilan gotas de suero salino (SSF, Braun®) en el OI para evitar la deshidratación. El OI sirve como control en este estudio.

De esta forma quedan establecidos en cada grupo 5 animales, el OD con tratamiento fotosensibilizador y el OI como control.

### *Evaluación Superficie Corneal*

Posterior a la cirugía se realizan los seguimientos en los animales en función de los tiempos establecidos para la obtención de datos sobre la evaluación de la córnea.

El grupo de largo plazo (18 meses) presenta los siguientes seguimientos:

- A los 4 meses.
- A los 6 meses.
- A los 8 meses.
- A los 18 meses.

### *Queratometrías corneales*

La superficie corneal anterior es esférica, al cambiar el radio de curvatura desde el centro (valor más bajo en mm) a la periferia (valor más alto en mm). Sin embargo la zona óptica central es esférica y es donde realizamos la medición queratométrica, el área de córnea central donde tomamos las medidas tiene aproximadamente 3 mm diámetro. Es un método de gran exactitud y fácilmente reproducible con un coste y mantenimiento reducido.

El queratómetro automático portátil KM-500 (Nidek®) proyecta una imagen luminosa (miras) sobre la córnea y el reflejo es captado por unos fotosensores. El procesador del queratómetro analiza esta imagen, realiza la medida en milímetros y determina el radio de curvatura. Además, calcula la potencia corneal total en dioptrías mediante una fórmula matemática, aplicando un

índice de refracción corneal orbitario propio del queratómetro.

Se coloca al animal en decúbito lateral izquierdo y se procede a un lavado de la superficie corneal del OD con suero salino fisiológico (SSF, Braun®). Una vez drenado todo el suero de la superficie corneal y de los sacos conjuntivales



Fig. 5. Toma de datos con queratómetro portátil.

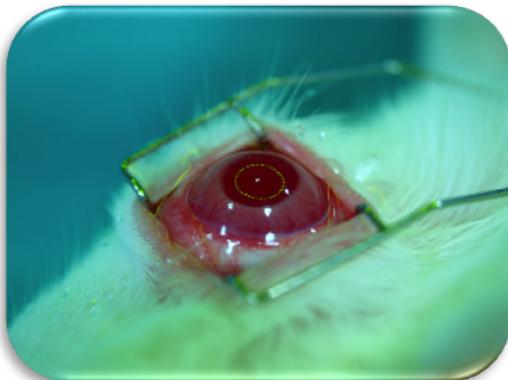


Fig. 6. Imagen corneal durante la toma de datos.

posicionamos el queratómetro de forma paralela a la córnea y obtenemos la lectura del radio de la superficie anterior de la córnea (Figs. 5 y 6). Se toman 3 medidas seguidas y se realiza la media para obtener un resultado más fiable.

Una vez realizado este procedimiento se efectúa en el ojo izquierdo.

### Topografías corneales

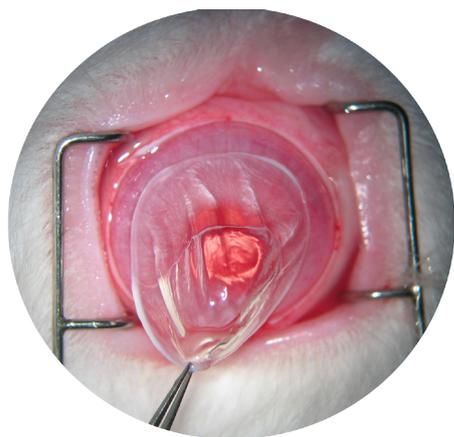
Los videoqueratoscopios, catalogados como análisis topográfico por sistema de reflexión, analizan una serie de círculos concéntricos reflejados por la córnea para calcular la pendiente de la superficie corneal y obtener de ella el radio de curvatura.



Fig. 7. Colocación del topógrafo corneal sobre el ojo del animal.

Una vez realizada la queratometría se ubica el topógrafo corneal (topógrafo corneal Eye Top® 2005 V.1.0 (CSO)) de forma paralela al OD para la obtención de las imágenes de la superficie corneal (Fig. 7). Una vez tomada esta información, se efectúa esta medida en el OI. La medida que se toma como referencia es el radio de curvatura de la córnea con un paso de 0,15 mm para apreciar de manera más exacta los detalles finos de la superficie corneal.

Una vez que se han realizado las medidas en los diferentes grupos, y tras completar el periodo de seguimiento establecido, se procede al sacrificio de los animales de acuerdo con los procedimientos sobre el uso de animales de experimentación (Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero de 2013 (B.O.E. nº34 del 8 de febrero), mediante la inyección de sobredosis de medicación anestésica y la inyección de cloruro potásico (KCl). Posteriormente se procede a la extracción de las muestras corneales (Fig. 8).



*Fig. 8. Toma de muestras. Extracción córnea.*

### *Estudio Histológico*

La realización de los estudios histológicos de las muestras se llevaron a cabo en el departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca por el Dr. Paz Bouza y en el laboratorio de Anatomía Patológica AnaPath de Granada.

Las muestras se remiten fijadas en formol y se procede a su inclusión en parafina, realizándose cortes de 4  $\mu\text{m}$  que se tiñen con hematoxilina eosina para manifestar las estructuras ácidas y basófilas

(núcleos celulares) y con Rojo Sirio para evaluar el estado de las fibras de colágeno y la disposición de las mismas en el estroma así como la posible presencia de artefactos de cicatrización.

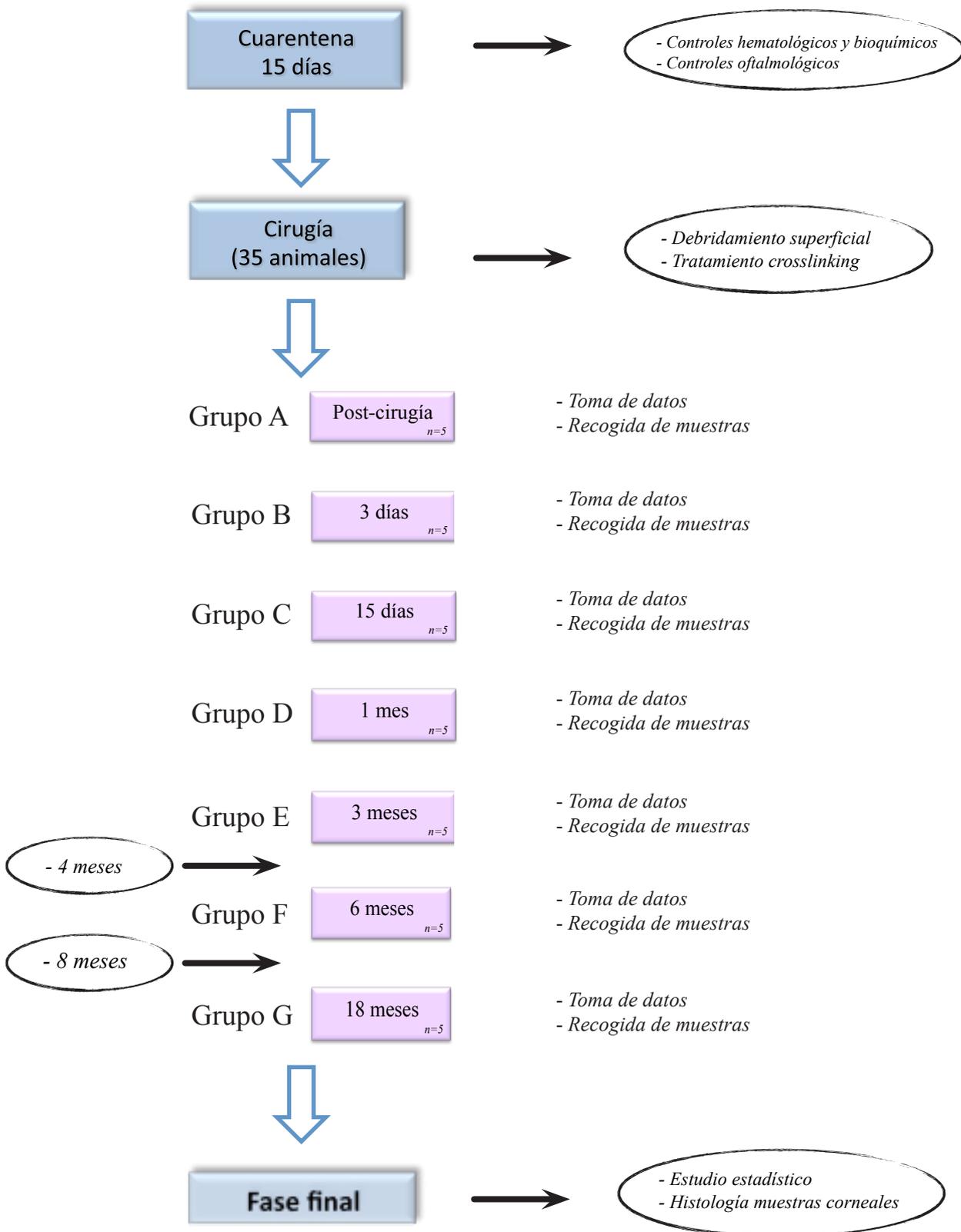
La valoración histológica se realizó valorando el grado de epitelización y profundidad de la úlcera de existir ésta, presencia de infiltrado inflamatorio y tipo, valoración de la membrana de Descemet, presencia de fibrosis o alteración en la estructura corneal y grado de apoptosis.

### *Análisis Estadístico*

Los datos se presentan mediante su media y desviación estándar. Se utiliza el paquete estadístico SPSS 15.0.1. (IBM Company, EEUU).

Dado el pequeño tamaño de la muestra la utilización de pruebas paramétricas no sería adecuada por lo que las posibles diferencias en los valores de radio corneal en función del tiempo y presencia o ausencia del tratamiento crosslinking se estudian mediante pruebas no paramétricas (Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon y Prueba de Mann-Whitney). Se considera significativo un valor de  $p < 0,05$ .

*Esquema Desarrollo Experimental*





## IV. Resultados

Los resultados de los análisis hematológicos y bioquímicos evidenciaron el correcto estado de salud de los 35 animales antes de la intervención, dado que los valores obtenidos permanecían dentro de los niveles considerados normales en la especie cunicula.

Los controles oftalmológicos demuestran el correcto estado de la córnea previa a la cirugía en cuanto a transparencia y ausencia de otras patologías oculares como queratoconjuntivitis seca, cicatrices corneales, etc.

### Queratometría

Los datos obtenidos en las medidas de la superficie anterior de la córnea, obtenidos mediante el uso del queratómetro automático portátil KM-500 (Nidek®), de los animales del estudio dan como resultado una media preoperatoria corneal de:

- Ojo derecho:  $7.63 \pm 0.74$  mm
- Ojo izquierdo:  $7.61 \pm 0.80$  mm

Se reflejan a continuación, y en función de los grupos de estudio, las medias de los datos postoperatorios de la superficie anterior corneal agrupados por grupo OD y grupo OI.

### Grupo A (postoperatorio) n=5

En el postoperatorio inmediato (Tabla 3), las modificaciones en el radio corneal del ojo tratado no presentan diferencias, mientras que en las modificaciones en el ojo izquierdo sí se muestran diferencias significativas respecto a los valores preoperatorios ( $p < 0.05$ ).

Como se puede apreciar en la gráfica de la evolución de las medias del radio de la superficie anterior de la córnea agrupadas en función de ojo

derecho y ojo izquierdo (Gráfica 1), ambos ojos presentan una mínima variación respecto a su media inicial.

	Media Km Ant	Media Km Post
Grupo OD	$7,959 \pm 0,263$	$7,849 \pm 0,226$
Grupo OI	$7,917 \pm 0,284$	$8,049 \pm 0,276$

Tabla 3. Medidas queratométricas. Grupo A.

### Grupo B (3 días) n=5

De igual forma que en el grupo anterior, las modificaciones en el radio corneal del ojo no tratado a los 3 días de realizado el tratamiento crosslinking no presentan diferencias, mientras que en las modificaciones en el ojo izquierdo sí se muestran diferencias significativas respecto a los valores preoperatorios ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

En la gráfica de la evolución de las medias de ambos ojos (ver Gráfica 2) se puede apreciar que ambos ojos siguen una evolución similar.

	Media Km Ant	Media Km Post	Media Km 3 días
Grupo OD	$6,420 \pm 0,172$	$6,782 \pm 0,491$	$6,593 \pm 0,455$
Grupo OI	$6,295 \pm 0,209$	$6,804 \pm 0,338$	$6,705 \pm 0,249$

Tabla 4. Medidas queratométricas. Grupo B.

### Grupo C (15 días) n=5

En el estudio estadístico realizado a los 15 días se observa una tendencia a un aumento en el radio corneal en el ojo tratado (aunque sin diferencias significativas) (Tabla 5).

En la gráfica correspondiente (Gráfica 3) se puede observar un ligero incremento en la media del radio de la superficie anterior de la córnea en el

ojo que ha recibido tratamiento respecto a su media preoperatorio. Sin embargo, en el ojo control, tras un ligero incremento en la medida postoperatoria, disminuye el valor del radio hasta alcanzar un valor similar al preoperatorio.

	Media Km Ant	Media Km Post	Media Km 15 días
Grupo OD	8,414 ± 0,239	8,519 ± 0,122	8,552 ± 0,208
Grupo OI	8,386 ± 0,147	8,458 ± 0,188	8,390 ± 0,192

Tabla 5. Medidas queratométricas. Grupo C.

### **Grupo D (1 mes) n=5**

La tendencia mostrada en los ojos tratados en el grupo C alcanza significación estadística ( $p < 0.05$ ) en el grupo de 1 mes respecto a los ojos no tratados (Tabla 6).

En la Gráfica 4 se puede observar cómo la media del radio de la superficie anterior de la córnea, en el ojo control, se mantiene en valores cercanos a las medias obtenidas en la toma de muestras pre y postoperatoria. Sin embargo, se aprecia en el ojo tratado un incremento evidente en la media del radio de la superficie anterior de la córnea respecto a la media preoperatoria, indicando un mayor aplanamiento corneal respecto a los valores iniciales (Gráfica 4).

	Media Km Ant	Media Km Post	Media Km 1 mes
Grupo OD	7,349 ± 0,195	7,448 ± 0,180	7,885 ± 0,321
Grupo OI	7,293 ± 0,254	7,541 ± 0,099	7,535 ± 0,214

Tabla 6. Medidas queratométricas. Grupo D.

### **Grupo E (3 meses) n=5**

En el estudio realizado en el grupo de 3 meses no se aprecian variaciones significativas (Tabla 7).

En la Gráfica 5 se aprecia un mayor aumento en la media del ojo tratado respecto a la media inicial que en el ojo control. No obstante este aumento es poco evidente (Gráfica 5).

	Media Km Ant	Media Km Post	Media Km 3 meses
Grupo OD	8,023 ± 0,207	8,263 ± 0,432	8,369 ± 0,388
Grupo OI	8,157 ± 0,159	8,503 ± 0,244	8,292 ± 0,288

Tabla 7. Medidas queratométricas. Grupo E.

### **Grupo F (6 meses) n=5**

Al igual que en el grupo anterior no se aprecian diferencias en el grupo de 6 meses en las queratometrías (Tabla 8).

En la gráfica correspondiente (Gráfica 6), se aprecia una evolución similar en ambos ojos. En el final del estudio ambos presentan una media del radio de la superficie anterior de la córnea similar entre ellos y ligeramente mayor a la media obtenida en el preoperatorio.

	Media Km Ant	Media Km Post	Media Km 6 meses
Grupo OD	7,829 ± 0,211	7,986 ± 0,369	8,202 ± 0,440
Grupo OI	7,953 ± 0,313	8,075 ± 0,299	8,238 ± 0,167

Tabla 8. Medidas queratométricas. Grupo F.

### **Grupo G (18 meses) n=5**

No se aprecian diferencias significativas en el grupo de 18 meses en las queratometrías (Tabla 9).

En la Gráfica 7 se puede apreciar como la media del radio de la superficie anterior de la córnea de los ojos tratados apenas sufre variación a lo largo del estudio, hasta obtener un mayor valor al final del estudio, lo que conlleva un mayor aplanamiento corneal respecto al valor preoperatorio (Gráfica 7).

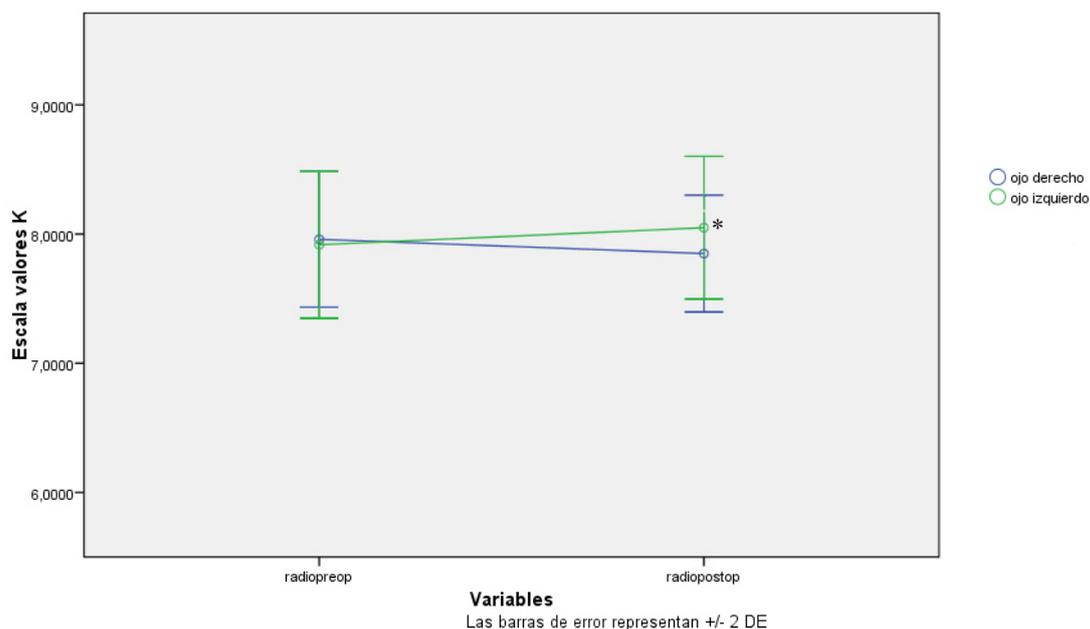
	Media Km Ant	Media Km Post	Media Km 4 meses	Media Km 8 meses	Media Km 18 meses
Grupo OD	7,896 ± 0,200	8,075 ± 0,159	8,086 ± 0,232	8,105 ± 0,175	8,345 ± 0,277
Grupo OI	7,923 ± 0,621	7,833 ± 0,441	8,015 ± 0,213	8,251 ± 0,234	8,569 ± 0,482

Tabla 9. Medidas queratométricas. Grupo G.

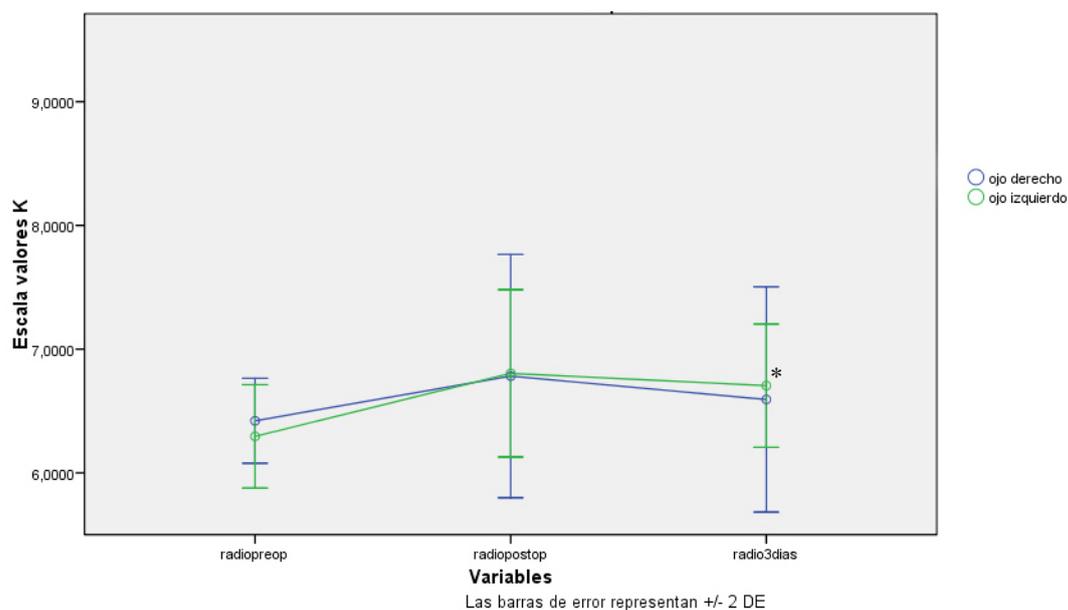
Por último, se realiza una comparativa de las medias obtenidas, en ambos ojos, agrupadas en función del tiempo del estudio (*Tabla 10 y Gráfica 8*). En esta última gráfica se aprecia la evolución a lo largo del estudio de las medias de ambos ojos, que se ha ido explicando de forma individual por grupos de estudio.

	Media Km Ant	Media Km Post	Media Km 3 días	Media Km 15 días	Media Km 1 mes	Media Km 3 meses	Media Km 4 meses	Media Km 6 meses	Media Km 8 meses	Media Km 18 meses
Grupo OD	7,699 ± 0,636	7,846 ± 0,611	6,593 ± 0,455	8,552 ± 0,208	7,885 ± 0,321	8,369 ± 0,388	8,086 ± 0,231	8,202 ± 0,439	8,105 ± 0,175	8,345 ± 0,277
Grupo OI	7,703 ± 0,723	7,888 ± 0,616	6,705 ± 0,249	8,390 ± 0,191	7,535 ± 0,214	8,292 ± 0,288	8,015 ± 0,213	8,238 ± 0,167	8,251 ± 0,234	8,569 ± 0,482

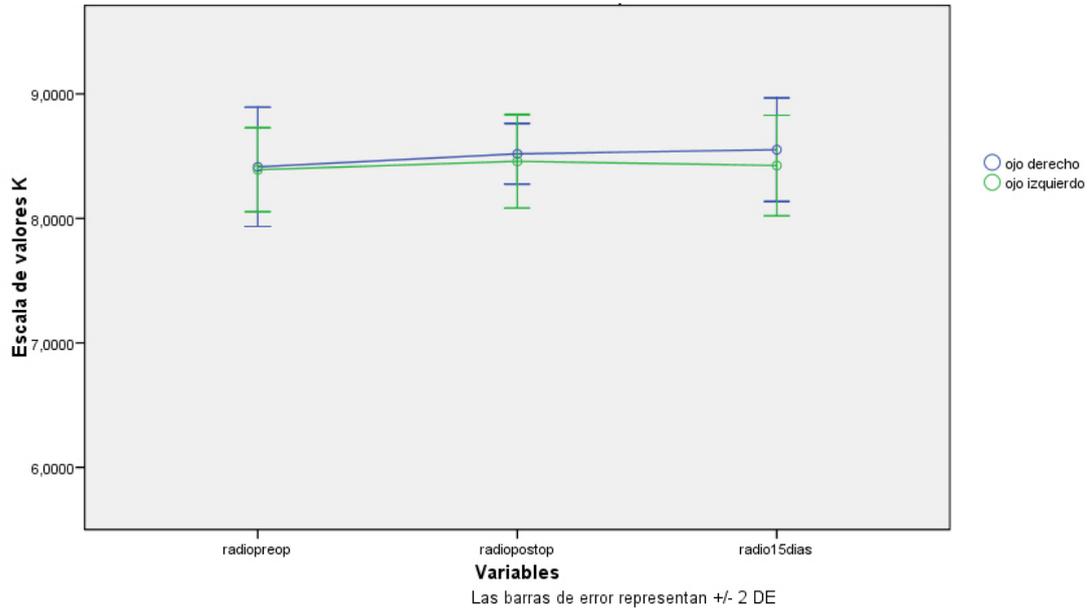
Tabla 10. Medidas queratométricas. Comparativa OD/OI a lo largo del estudio.



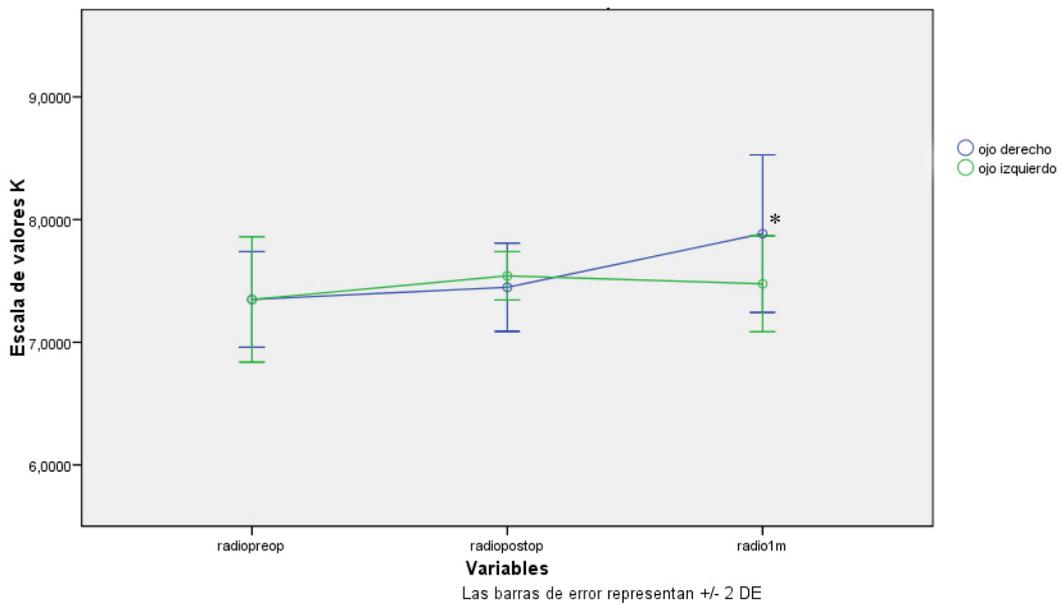
Gráfica 1. Evolución de la superficie anterior de la córnea (en mm) en ambos ojos. Grupo A. Se marca con asterisco la diferenciación significativa.



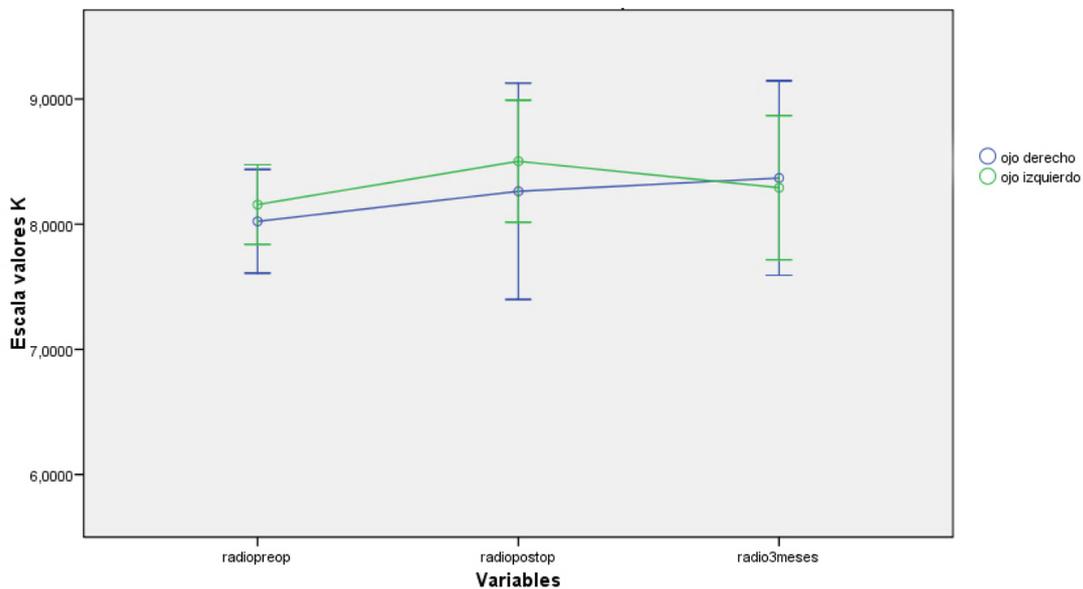
Gráfica 2. Evolución de la superficie anterior de la córnea (en mm) en ambos ojos. Grupo B. Se marca con asterisco la diferenciación significativa.



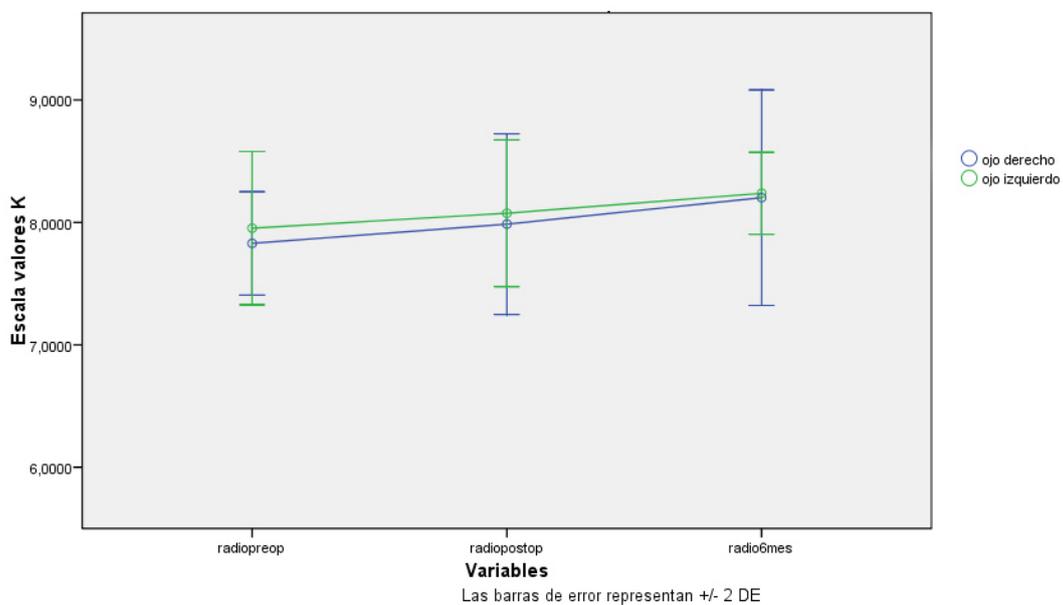
Gráfica 3. Evolución de la superficie anterior de la córnea (en mm) en ambos ojos. Grupo C.



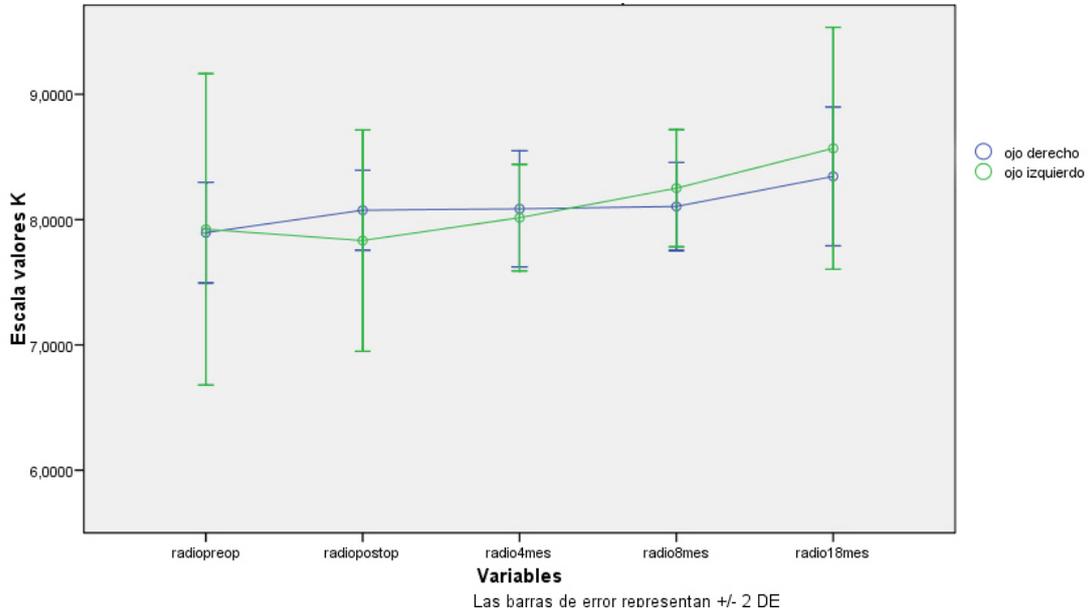
Gráfica 4. Evolución de la superficie anterior de la córnea (en mm) en ambos ojos. Grupo D. Se marca con asterisco la diferenciación significativa.



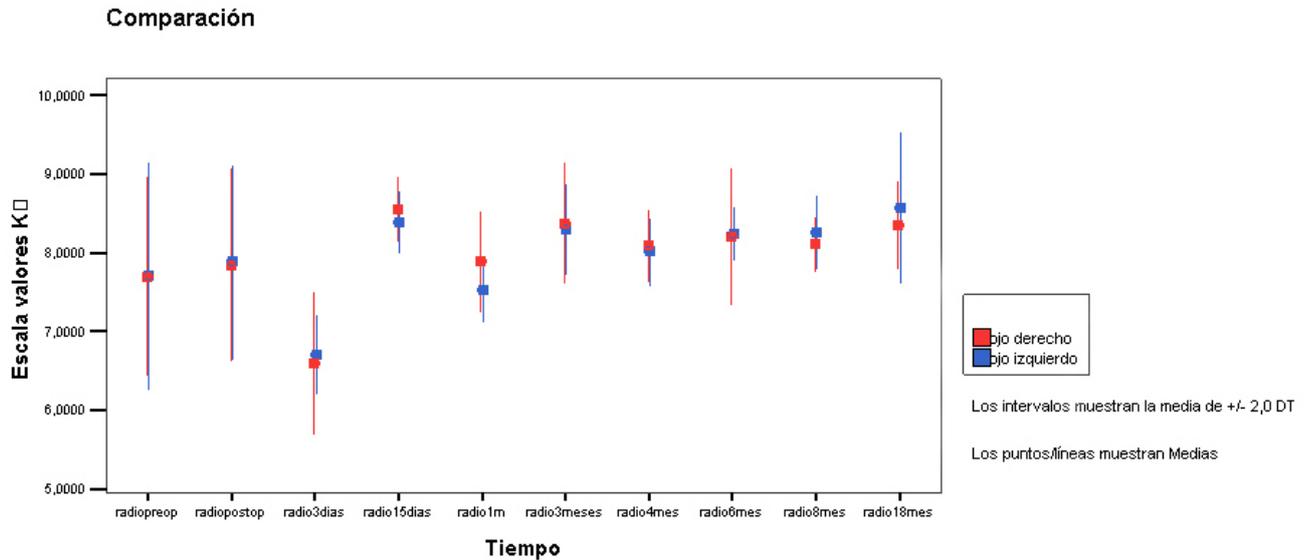
Gráfica 5. Evolución de la superficie anterior de la córnea (en mm) en ambos ojos. Grupo E.



Gráfica 6. Evolución de la superficie anterior de la córnea (en mm) en ambos ojos. Grupo F.



Gráfica 7. Evolución de la superficie anterior de la córnea (en mm) en ambos ojos. Grupo G.



Gráfica 8. Evolución de la superficie anterior de la córnea (en mm) en ambos ojos OD/OI a lo largo del estudio.

## Topografía corneal

Se presentan los resultados de un animal (por grupo) elegido aleatoriamente utilizando los mapas axiales y representando la curvatura (en mm) en cada punto respecto del eje óptico corneal. Para facilitar la comprensión de los resultados presentados se realizan mapas de diferencias, por grupo de estudio, respecto a la toma de topografía corneal preoperatoria y la toma de topografía corneal de final de estudio.

El área corneal se divide en áreas:

- Zona óptica central (aproximadamente 4 mm).
- Zona periférica (hasta el limbo esclerocorneal).
- Zona limbar.

En el mapa axial utilizado las zonas frías (colores fríos) indican un mayor radio de curvatura (zona más plana de la córnea) y las zonas cálidas (colores cálidos) indican una zona más curvada, luego de mayor potencia óptica.

### Grupo A (postoperatorio)

Se aprecia en la imagen postoperatoria (*Fig. 9*) una mayor presencia de colores cálidos en la zona óptica central que puede indicar una mayor curvatura corneal en esa zona debido a la inflamación producida por el debridamiento superficial realizado.

No obstante, en los resultados de las medias de los valores k en el mapa diferencial, se observa que la media del mapa postoperatorio es ligeramente menor que la obtenida en el mapa preoperatorio (*Fig. 9*). En este sentido, cabe señalar que las topografías corneales postoperatorias no son de mucha fiabilidad dado que es complicado que el reflejo de los anillos de Plácido, que emite el topógrafo, muestre una imagen regular, ya que la calidad de la imagen depende del estado cualitativo y la

regularidad de la superficie de esa córnea y de la calidad de la lágrima.

### Grupo B (3 días)

Se observa en la imagen postoperatoria (*Fig. 10*) una mayor presencia de colores fríos en comparación con la imagen preoperatoria. A partir de esta imagen se advierte un ligero aplanamiento en la superficie corneal respecto al eje óptico corneal, que se confirma observando las medias del mapa diferencial en el que se ha obtenido una media de 6,85 mm de radio de la superficie anterior de la córnea frente a los 6,50 mm del mapa preoperatorio. Esta diferencia es mínima y junto con las medidas queratométricas se puede concluir en que no presenta un cambio significativo.

### Grupo C (15 días)

La imagen postoperatoria de este grupo (*Fig. 11*) indica un claro aplanamiento de la superficie corneal respecto al eje óptico, que viene demostrado por la mayor presencia de colores fríos en la zona periférica y limbar. La zona óptica central presenta una zona de aproximadamente 1,5 mm de mayor curvatura en el cuadrante inferior (representada por colores cálidos) que puede deberse a una alteración de la arquitectura de la córnea en esa zona por una cicatrización incompleta.

Al observar las medidas en el mapa diferencial se puede apreciar un mayor valor en la media de los valores k (8,15 mm) respecto a la media de los valores preoperatorios (7,60 mm) que confirma de forma cuantitativa ese aplanamiento que se observa en el mapa axial postoperatorio.

### Grupo D (1 mes)

Se aprecia en la imagen postoperatoria (*Fig. 12*), una clara presencia de colores fríos en la totalidad de las áreas a evaluar en la córnea (zona óptica central, zona periférica y zona limbar). Este mapa axial postoperatorio está indicando un

aplanamiento significativo respecto al mapa axial preoperatorio en el que se aprecia mayor presencia de colores cálidos. De igual forma se puede observar en el mapa diferencial un aplanamiento respecto al eje óptico corneal de 1,06 mm en el radio de la superficie anterior de la córnea.

### **Grupo E (3 meses)**

En el mapa axial postoperatorio de este sujeto (*Fig. 13*) se aprecia una mayor presencia de colores fríos en las zonas periférica y limbar en comparación con el mapa axial preoperatorio, lo que indica un mayor aplanamiento del ojo a los 3 meses del tratamiento respecto a su valor inicial. En la zona óptica se puede apreciar la presencia de colores cálidos que señalan una ligera curvatura de esa zona. Esta zona no presenta un cambio significativo como se puede comprobar mediante el estudio estadístico de los valores k obtenidos en el mapa diferencial. A pesar de esos valores k de la zona óptica central más disminuídos se obtiene una media mayor (8,14 mm) respecto a la obtenida en el mapa preoperatorio (7,62 mm).

### **Grupo F (6 meses)**

A los 6 meses del tratamiento el mapa axial (*Fig. 14*) que se obtiene es similar a los grupos D y E sin apenas variaciones, dato que se confirma a través de las medidas queratométricas.

Se aprecia una clara presencia de colores fríos en las 3 áreas evaluadas de la córnea, lo que

conlleva un mayor aplanamiento de la superficie corneal con respecto al estado preoperatorio. Este aplanamiento se puede comprobar de forma cuantitativa en el mapa diferencial observando la diferencia en la media de los valores k obtenidos en ambos mapas, con un incremento de 0,60 mm en el radio de la superficie anterior de la córnea a los 6 meses del tratamiento postoperatorio.

### **Grupo G (18 meses)**

En el último grupo de estudio, al igual que en los 3 grupos anteriores, se observa un mapa axial postoperatorio (*Fig. 15*) con predominancia de colores fríos en las áreas de la córnea evaluadas (zona óptica central, periférica y limbar) indicando mayor aplanamiento respecto al eje óptico corneal que en el estado preoperatorio.

La media de los valores k obtenidos en el mapa diferencial señala un aplanamiento de 0,59 mm respecto al mapa axial preoperatorio, lo que confirma el aplanamiento de la superficie corneal ya descrito cualitativamente.

En resumen, a lo largo de los tiempos de seguimiento se puede observar un aplanamiento de la curvatura corneal en los ojos tratados. Cabe destacar a los 3 días de realizado el tratamiento crosslinking cómo se inicia el cambio en la superficie corneal y la constancia en la estabilidad de ese aplanamiento a lo largo del estudio hasta los 18 meses.

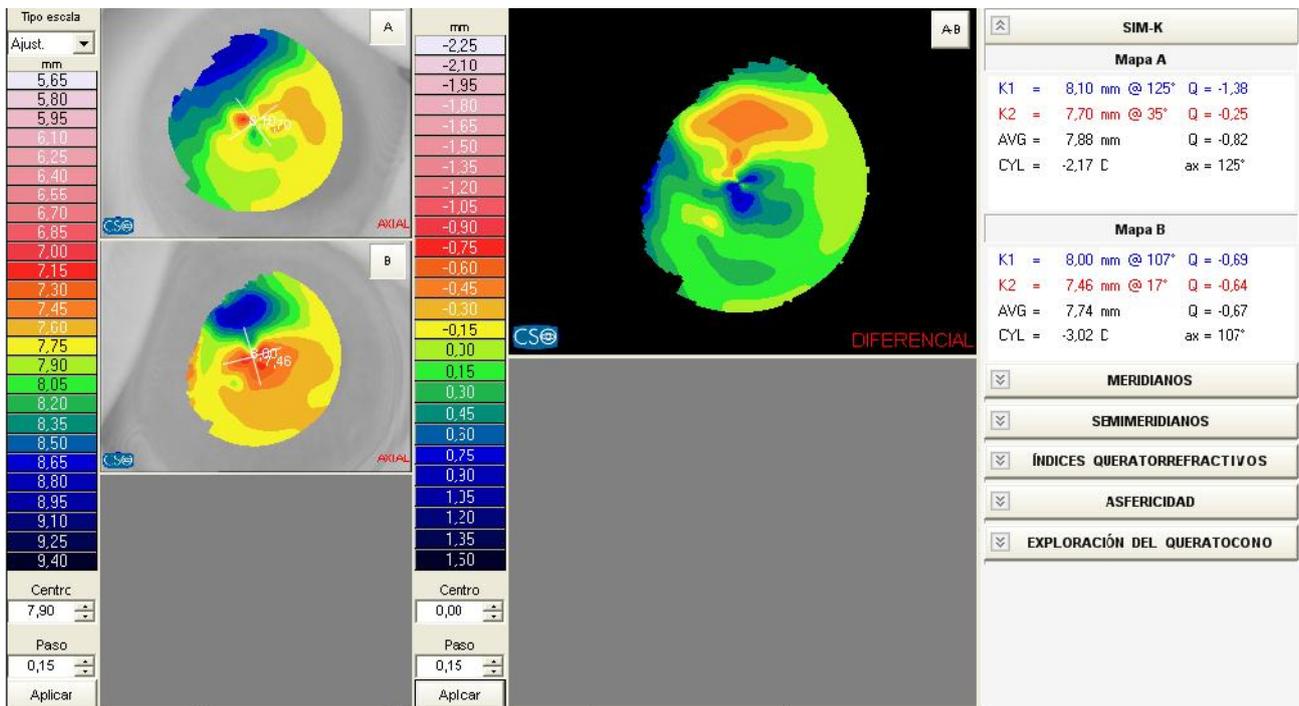


Fig. 9. Topografía en el sujeto del Grupo A. Mapas axiales del preoperatorio y del postoperatorio. Apenas se aprecian diferencias en la superficie ocular pre y post-tratamiento.

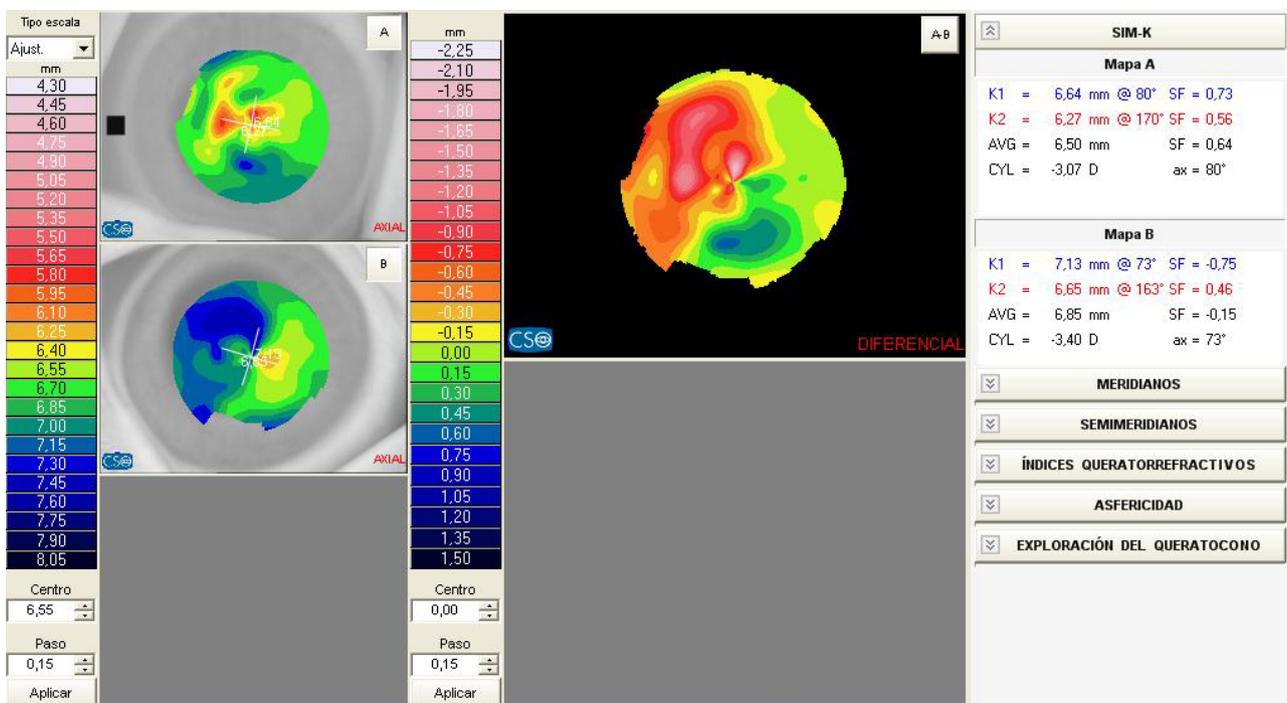


Fig. 10. Topografía en el sujeto del Grupo B. Mapas axiales del preoperatorio y a los 3 días del tratamiento. Nótese el incremento de colores fríos indicando un inicio de aplanamiento corneal.

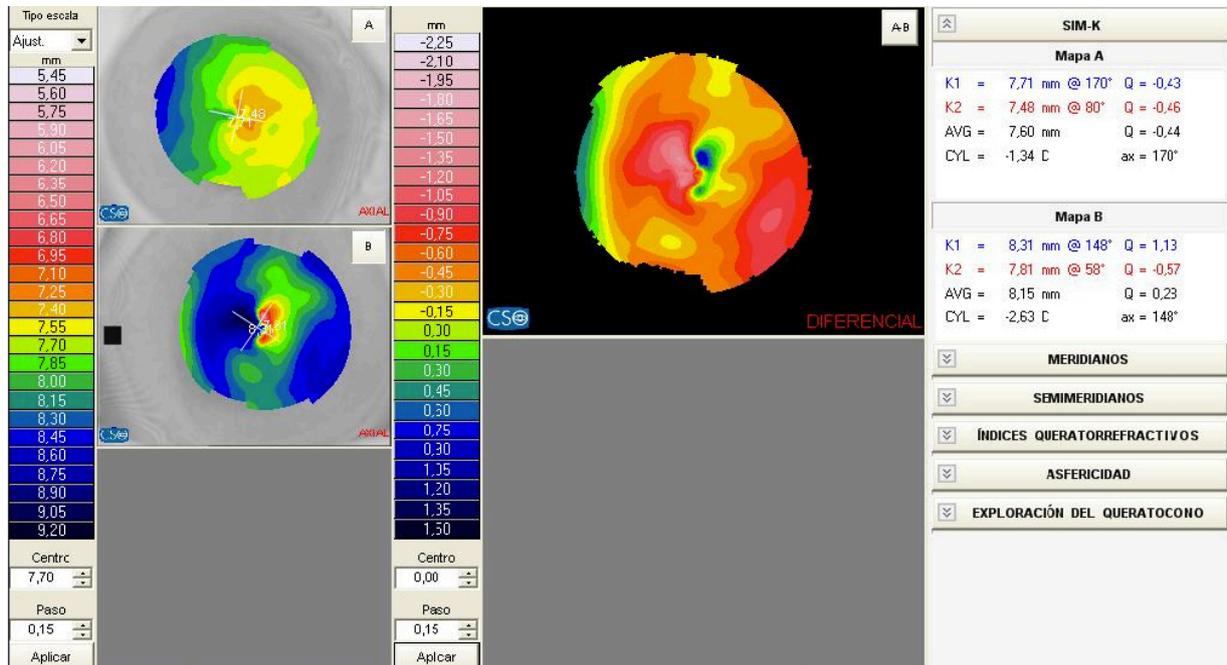


Fig. 11. Topografía en el sujeto del Grupo C. Mapas axiales del preoperatorio y a los 15 días del tratamiento. Nótese la persistencia en los colores fríos a excepción de la zona óptica central.

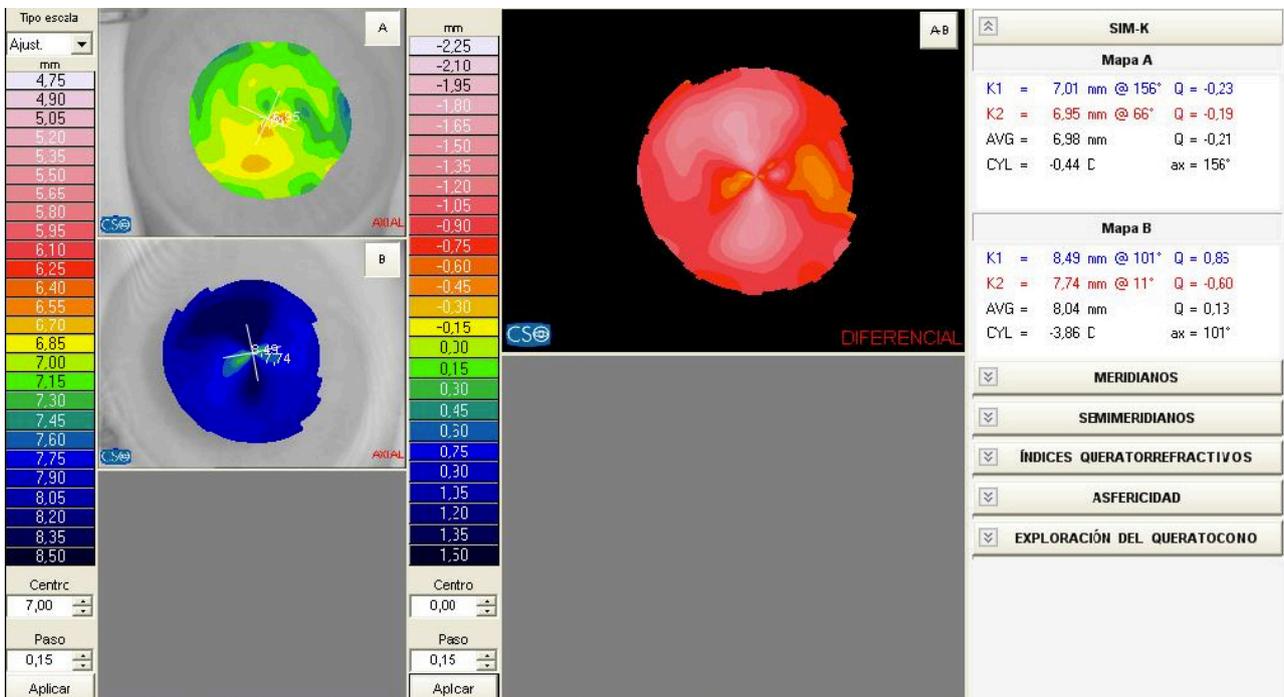


Fig. 12. Topografía en el sujeto del Grupo D. Mapas axiales del preoperatorio y al mes del tratamiento. Obsérvese la presencia de colores fríos en toda la superficie corneal en la imagen postoperatoria.

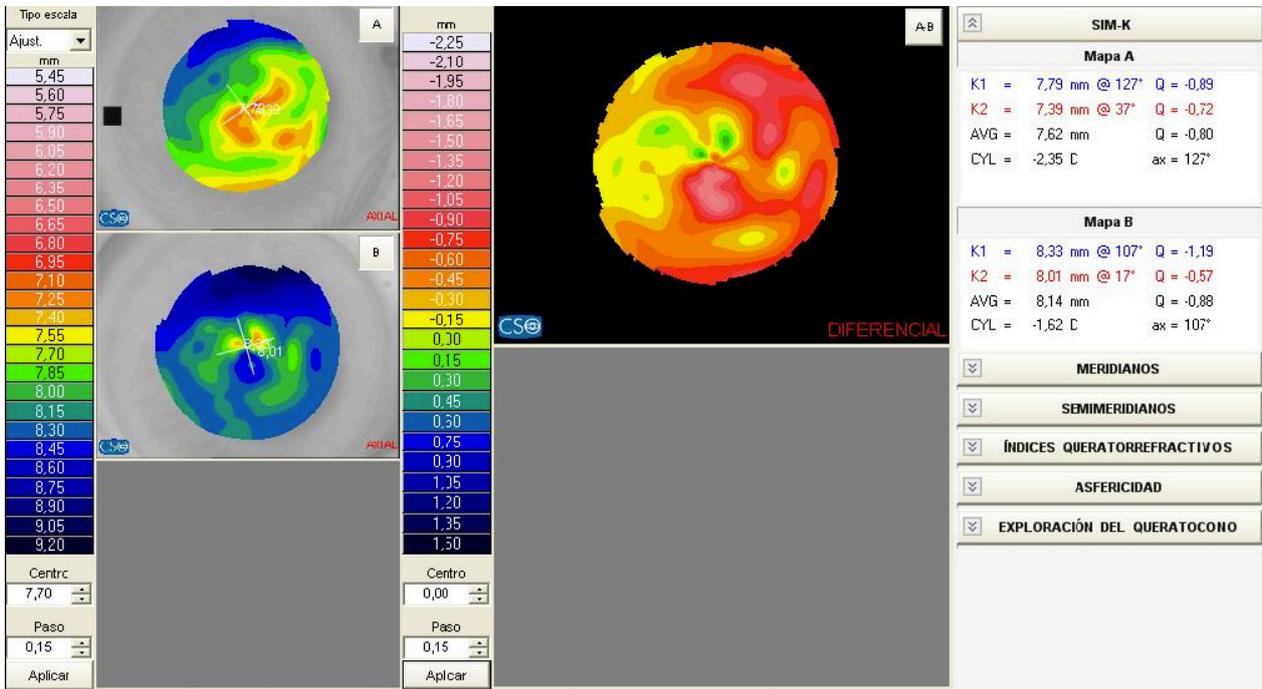


Fig. 13. Topografía en el sujeto del Grupo E. Mapas axiales del preoperatorio y a los 3 meses del tratamiento. Obsérvese la presencia de colores fríos a excepción de la zona óptica central.

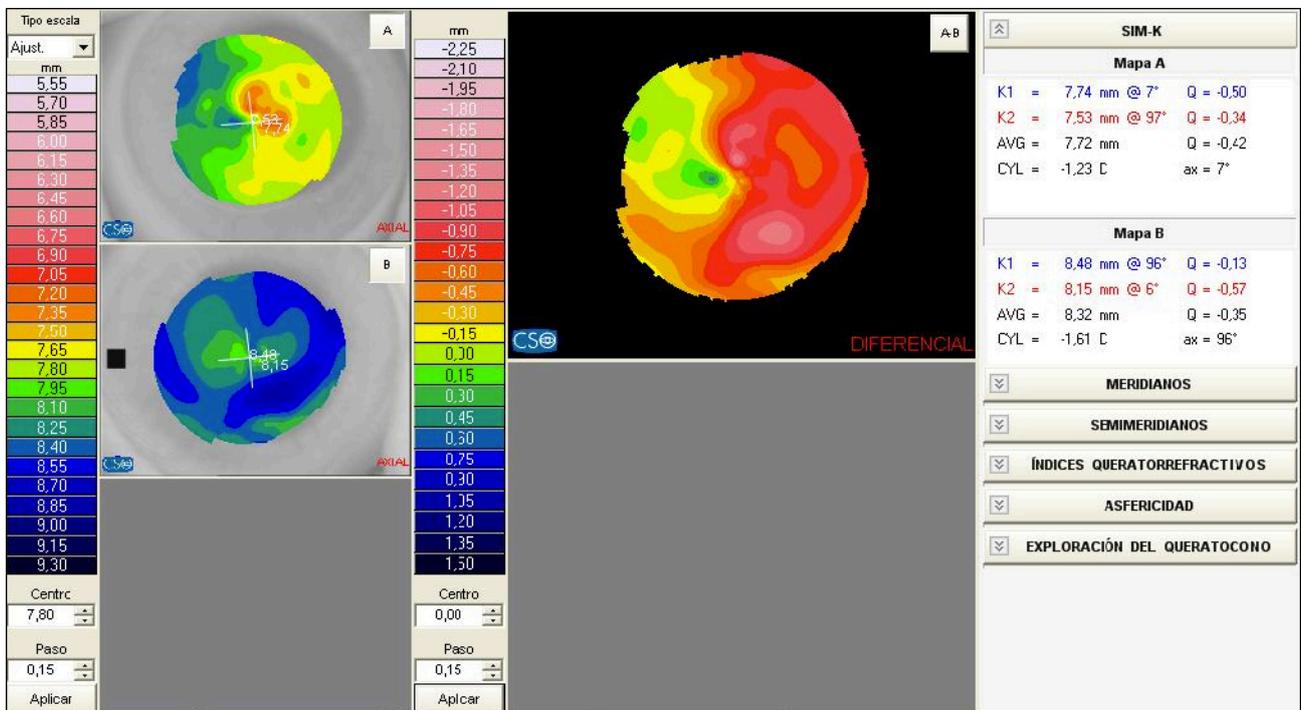


Fig. 14. Topografía en el sujeto del Grupo F. Mapas axiales del preoperatorio y a los 6 meses del tratamiento. Obsérvese la presencia de colores fríos en toda la superficie corneal en la imagen postoperatoria.

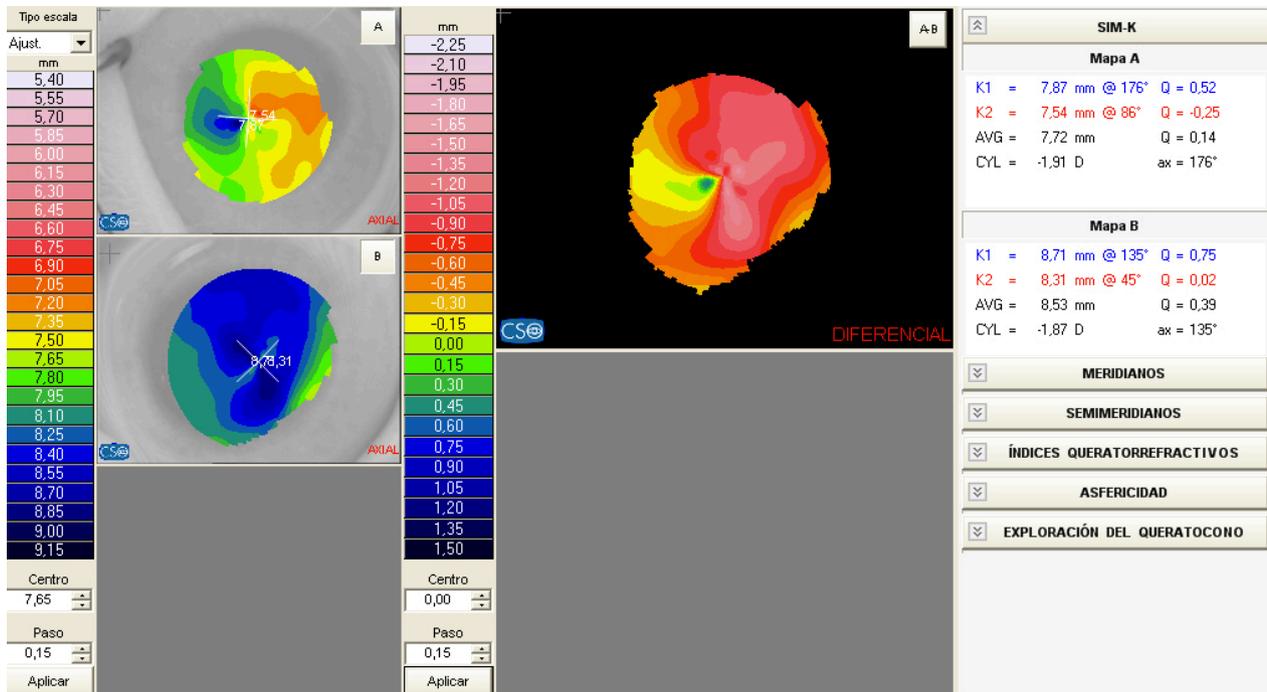


Fig. 15. Topografía en el sujeto del Grupo G. Mapas axiales del preoperatorio y a los 18 meses del tratamiento. Obsérvese la presencia de colores fríos en toda la superficie corneal en la imagen postoperatoria.

## Análisis histológico

Se reflejan a continuación y en función de los tiempos de estudio los resultados de la histología corneal en cada uno de los grupos de estudio (muestras seleccionadas aleatoriamente).

### Grupo A: postoperatorio

En los ojos derechos de este grupo, se observan zonas necróticas en el área central de irradiación y no se aprecia la estructura horizontal de las laminillas de colágeno. Se aprecia también la localización anterior de los espacios intercelulares y una línea de demarcación a una profundidad de  $250 \pm 20 \mu\text{m}$ . Se mantiene la lámina basal del epitelio (Fig. 16).

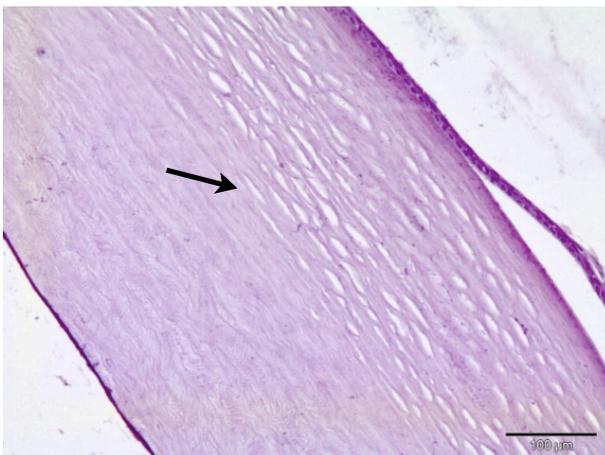


Figura 16. Corte histológico ojo derecho. Tinción HE. Grupo A. Señalada línea demarcación del tratamiento (flecha)(x10).

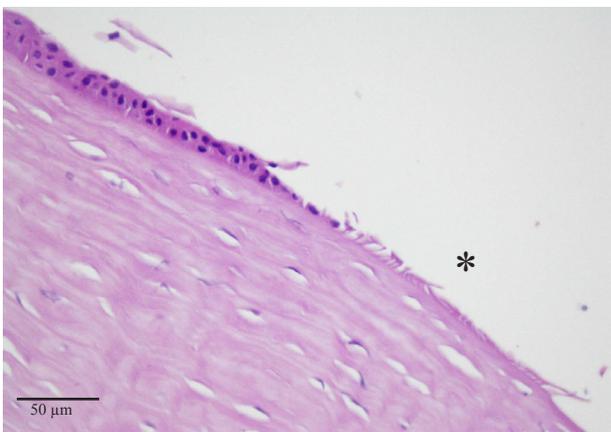


Figura 17. Corte histológico ojo izquierdo. Tinción HE. Grupo A. Nótese la debridación epitelial producida (asterisco) (x20).

En los ojos izquierdos se observa una menor zona y profundidad afectada. Sólo se aprecia la pérdida de epitelio (Fig. 17).

### Grupo B: 3 días

En general, en los ojos derechos se observa un adelgazamiento del epitelio y la presencia de un infiltrado inflamatorio de tipo crónico formado sobre todo por linfocitos en las capas más basales. Ausencia de núcleos en el estroma. También se observa la formación de vesículas entre la capa basal y la membrana de Descemet, con lo que el epitelio se separa de ésta en un proceso denominado queratopatía bullosa. Concretamente en la imagen histológica (Figs. 18 y 19) se observa una pérdida de epitelio, multifocal aunque de pequeño tamaño, asociada a un infiltrado severo.

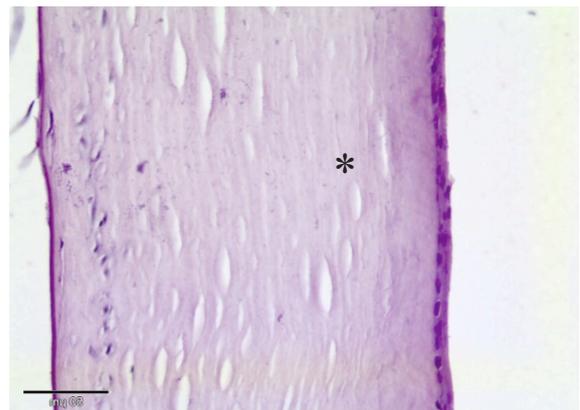


Figura 18. Corte histológico ojo derecho. Tinción HE. Grupo B. Nótese la ausencia de núcleos en el estroma (asterisco)(x10).

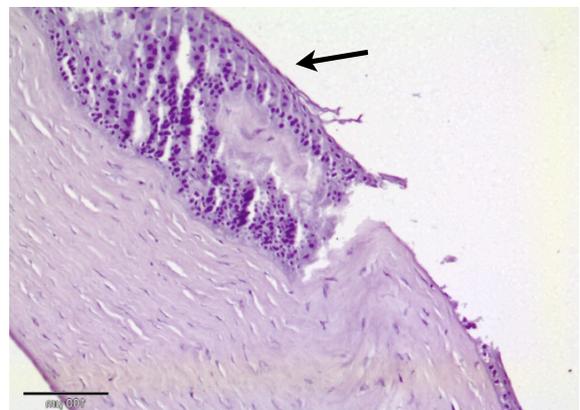


Figura 19. Detalle de la pared corneal. Corte histológico ojo derecho. Tinción HE. Grupo B. Obsérvese el infiltrado en el área epitelial (flecha) (x10).

La membrana de Descemet no presenta alteraciones histológicas de interés.

En el estroma de las córneas se observa un aumento del grosor y una pérdida de células estromales, manteniéndose sólo la matriz. Esta pérdida ocupa la práctica totalidad del grosor de la córnea, apareciendo tan sólo una pequeña capa de células en la parte más cercana al endotelio. Este último no se encuentra afectado en ninguna de las muestras.

Los ojos izquierdos presentan un epitelio con un número de capas normal o ligeramente aumentado (Fig. 20). Las células que constituyen las capas

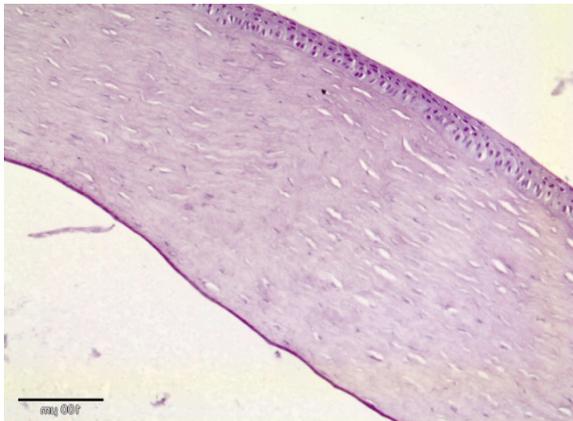


Figura 20. Corte histológico ojo izquierdo. Tinción HE. Grupo B. (x10).

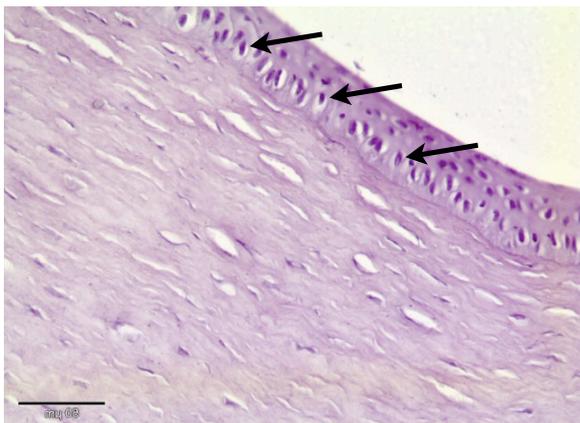


Figura 21. Detalle de la pared corneal. Corte histológico ojo izquierdo. Tinción HE. Grupo B. Señalada la vacuolización citoplasmática de las capas más basales del epitelio (flechas)(x20).

más basales invaden ligeramente el estroma y presentan una vacuolización citoplasmática (Fig.

21). Así mismo, se observa una recuperación de las células estromales, de manera que a lo largo de la córnea se observan los núcleos de estas células con un grosor normal. Ni la membrana de Descemet ni el endotelio se ven afectados.

Sólo en un sujeto, el ojo izquierdo se aleja de esta imagen más cercana a la normalidad y presenta un adelgazamiento y una pequeña ulceración del epitelio. Esta ulceración se acompaña de un infiltrado inflamatorio constituido principalmente por polimorfonucleares neutrófilos que aparecen en la parte más superficial pero que también se encuentran a lo largo del estroma corneal. Sin embargo, no se observa pérdida de las células estromales ni alteración en el endotelio.

Mediante la tinción específica de colágeno Rojo Sirio, en el ojo derecho la disminución del colágeno se evidencia como una disminución en la

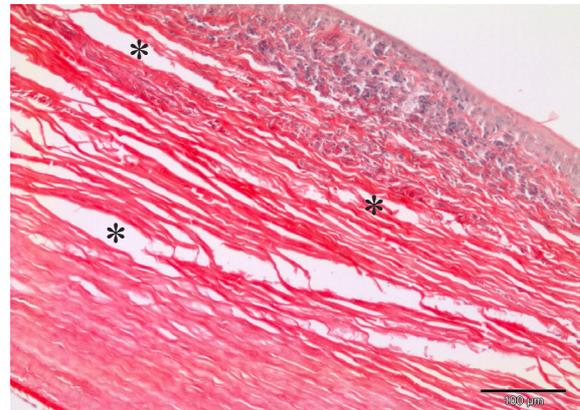


Figura 22. Tinción específica Rojo Sirio. Ojo derecho. Grupo B. Presencia de espacios intercelulares (asteriscos) (x20).

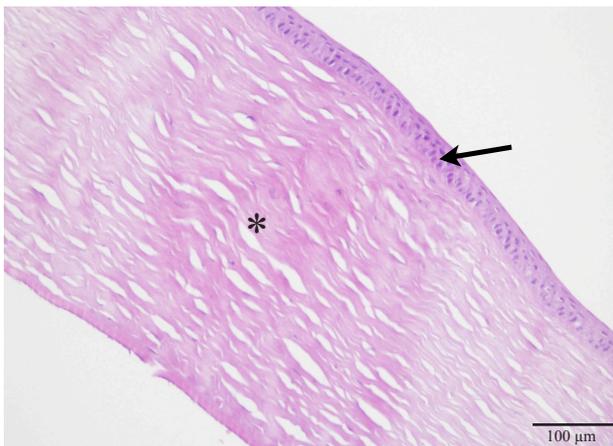


Figura 23. Tinción específica Rojo Sirio. Ojo izquierdo. Grupo B. Nótese la compacidad estromal (asterisco) (x20).

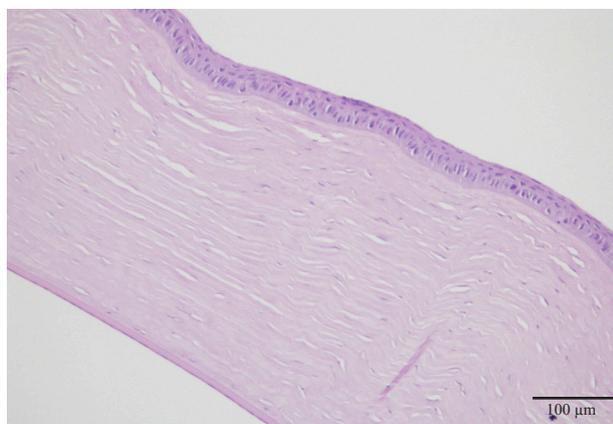
intensidad de la tinción en el estroma (*Fig. 22*) y bajo la zona de inflamación así como los espacios intercelulares en el estroma corneal. En el ojo izquierdo, sin embargo, no se observa ninguna zona de pérdida de colágeno ya que la tinción es intensa (*Fig. 23*). Se aprecia una mayor compacidad en el estroma corneal y casi inexistencia de espacios intercelulares.

### **Grupo C: 15 días**

En los ojos derechos se observa una completa recuperación del epitelio corneal, así como una proliferación de la lámina cúbica. La estructura de laminillas estromales horizontales es la correcta aunque persisten los espacios intercelulares (en menor medida que en el grupo 3 días) (*Fig. 24*).



*Figura 24. Corte histológico ojo derecho. Tinción HE. Grupo C. Nótese la proliferación de la lámina cúbica (flecha) y los espacios intercelulares (asterisco) (x10).*



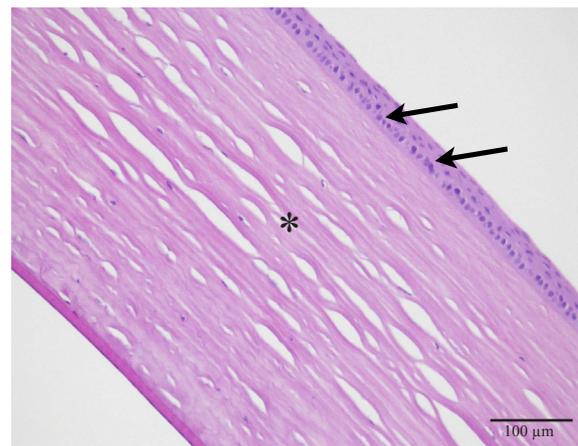
*Figura 25. Corte histológico ojo izquierdo. Tinción HE. Grupo C. (x10).*

En los ojos izquierdos se observa una completa recuperación del epitelio, con presencia de células cúbicas. El estroma corneal se aprecia más compacto que en el ojo derecho, con escasos espacios intercelulares (*Fig. 25*).

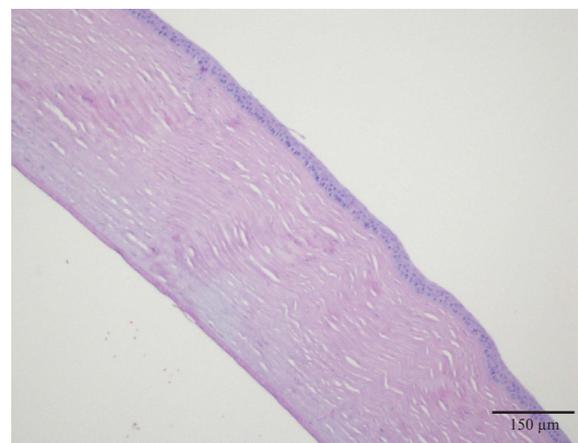
No se aprecia alteración de la membrana de Descemet y del endotelio en ninguno de los cortes procesados.

### **Grupo D: 1 mes**

En los ojos derechos aumenta la proliferación de células cúbicas en el epitelio, alcanzando 4 ó 5 capas aproximadamente. Esta proliferación se da sobre todo en las zonas centrales de la córnea, en la periferia no se aprecia. Se aprecia una membrana



*Figura 26. Corte histológico ojo derecho. Tinción HE. Grupo D. Nótese la proliferación de la lámina cúbica (flechas) y la mayor orientación paralela de las láminas de colágeno (asterisco) (x10).*



*Figura 27. Corte histológico ojo izquierdo. Tinción HE. Grupo D. (x10).*

limitante de las células cúbicas más engrosada de lo normal (Fig. 26).

En las muestras de los ojos izquierdos se observa la proliferación de las células cúbicas del epitelio y una correcta organización arquitectónica del estroma corneal con presencia de espacios intercelulares en zonas aleatorias. Se diferencia muy fácilmente la membrana limitante de las células cúbicas al poseer mayor tinción (Fig. 27).

### **Grupo E: 3 meses**

En los ojos derechos se mantienen las 4 ó 5 capas de células cúbicas en el epitelio. Se aprecia

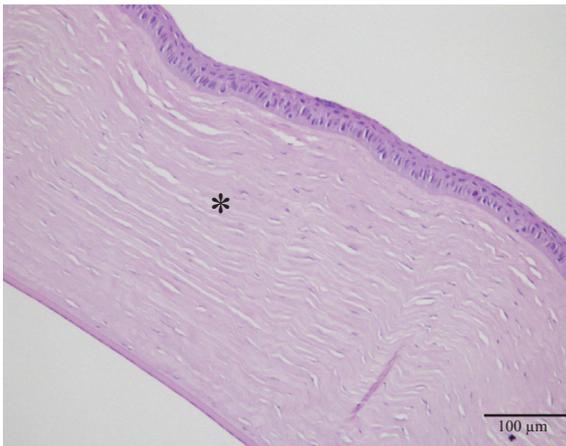


Figura 28. Corte histológico ojo derecho. Tinción HE. Grupo E. Nótese la mayor orientación paralela de las láminas de colágeno (x10).

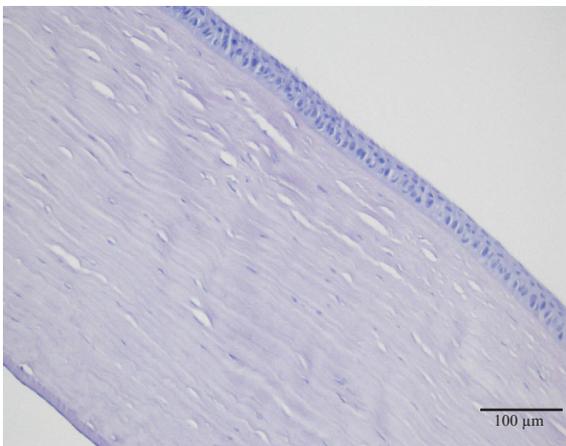


Figura 29. Corte histológico ojo izquierdo. Tinción HE. Grupo E. (x10). No se observan alteraciones.

el epitelio más maduro con menor proliferación de la capa basal. La membrana interna está más engrosada. Las fibras de colágeno se aprecian separadas con espacios intercelulares (Fig. 28).

En las muestras de los ojos izquierdos se observa la proliferación de las células cúbicas del epitelio y una correcta organización arquitectónica del estroma corneal con presencia de espacios intercelulares en zonas aleatorias. Se diferencia muy fácilmente la membrana limitante de las células cúbicas al poseer mayor tinción (Fig. 29).

### **Grupo F: 6 meses**

Todas las muestras de ambos ojos manifiestan una arquitectura corneal normal (Figs. 30 y 31). El

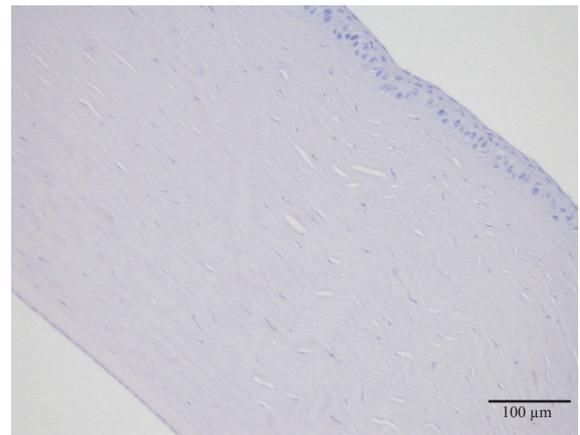


Figura 30. Corte histológico ojo derecho. Tinción HE. Grupo F. (x10). No se observan alteraciones.

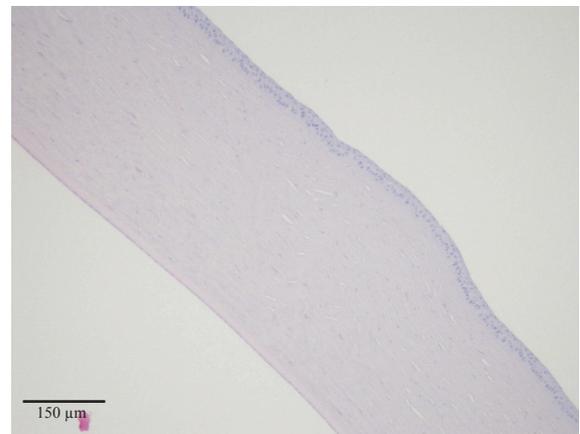
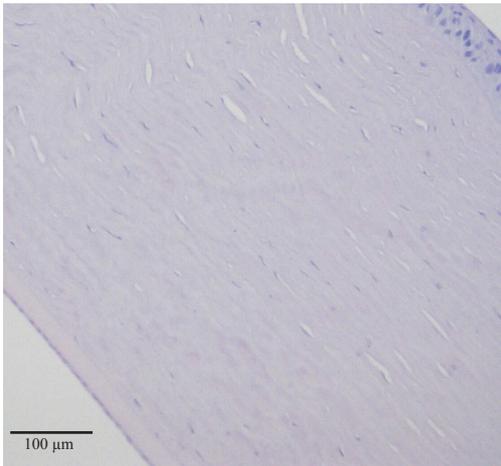
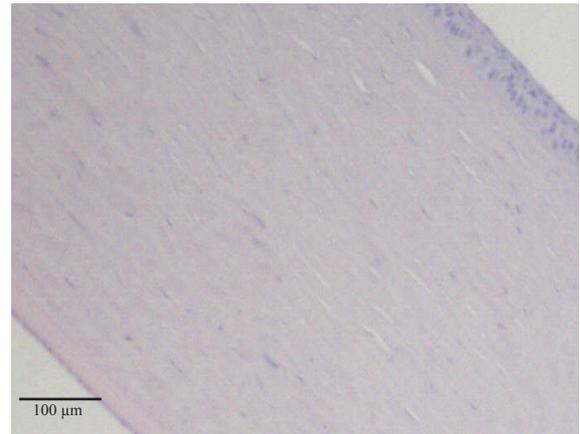


Figura 31. Corte histológico ojo izquierdo. Tinción HE. Grupo F. (x10). No se observan alteraciones.



*Figura 32. Corte histológico ojo derecho. Tinción HE. Grupo G. (x20). No se observan alteraciones.*



*Figura 33. Corte histológico ojo izquierdo. Tinción HE. Grupo G. (x20). No se observan alteraciones.*

epitelio está correctamente desarrollado y maduro, el estroma corneal mantiene las laminillas de colágeno horizontales sin apenas espacios intercelulares. Asimismo, la membrana de Descemet y el endotelio se muestran en perfectas condiciones.

### **Grupo G: 18 meses**

Al igual que en el caso anterior, todas las muestras manifiestan una arquitectura corneal normal a todos los niveles (epitelio y estroma) (*Figs. 32 y 33*). De igual forma el endotelio y la membrana de

Descemet no muestran ninguna alteración.

Los análisis histológicos confirman la localización anterior del tratamiento crosslinking en el estroma. Se observa una pronta repoblación de los queratocitos y una completa regeneración epitelial a los 15 días, con permanencia de la proliferación de la lámina cúbica. Cabe destacar que al mes de la aplicación del tratamiento crosslinking ya empiezan a reorientarse las lamelas de colágeno en el estroma.



## V. Discusión

La finalidad del presente trabajo es la de instaurar una base experimental para la realización de los estudios clínicos. En la actualidad, la mayor parte de los estudios realizados con humanos no tienen un apoyo firme en resultados experimentales. Es la primera vez que se describe un estudio a largo plazo en la córnea de animal vivo y, las medidas queratométricas obtenidas a lo largo del estudio, los cambios realizados en las topografías corneales así como el análisis de las muestras histológicas conlleva una información que hasta ahora era desconocida dado que los estudios experimentales se realizaban *in vitro* o *in vivo* de corta duración. Por otra parte cabe destacar la importancia de la escasa tasa de complicaciones obtenidas (2,86% del total de animales) de cara a su extrapolación en humanos y la pronta recuperación de la población de queratocitos.

Las ectasias corneales representan un grupo de desórdenes caracterizado por una debilidad intrínseca de la córnea y una estabilidad que conduce a una protrusión, astigmatismo, pérdida de agudeza visual e incluso potencialmente una perforación<sup>22</sup>.

Durante la última década el estudio sobre las ectasias corneales ha sufrido un incremento exponencial debido al gran aumento en el número de operaciones de corrección de errores refractivos, tales como la miopía. La ectasia corneal posterior a una cirugía refractiva apenas se consideraba inusual y actualmente es la complicación más frecuente de este tipo de cirugías<sup>48, 51</sup>.

De este tipo de alteraciones corneales, el queratocono es el primer representante afectando a uno de cada 2000 habitantes<sup>22</sup>. El queratocono es un desorden no inflamatorio, usualmente bilateral, que se manifiesta como una inestabilidad corneal progresiva caracterizada por un adelgazamiento anormal y una elevación de la córnea<sup>20, 22, 23</sup>. La aparición de una curvatura anormal de la córnea

produce un cambio en su poder refractivo, que resulta en un astigmatismo irregular y una miopía que conllevan a una disminución en la calidad de la visión.

Hasta la fecha, las causas responsables del desarrollo del queratocono permanecen sin definir. Lo más común es que se presenta como un desorden esporádico, en el cual una minoría de pacientes (6-15%) refieren un historial familiar con transmisión autosómica dominante o recesiva.

A nivel histopatológico y bioquímico, las córneas queratocónicas se caracterizan por un incremento en los niveles de proteasas y otras enzimas catabólicas, disminución de los niveles de inhibidores de las metaloproteinasas, un incremento de la actividad colagenolítica, muerte por apoptosis de los queratocitos y cambios bruscos en la orientación y distribución del colágeno<sup>256</sup>.

Los tratamientos aplicados son de dirección conservativa y que tienen como objetivo mantener la agudeza visual, tales como la ortoqueratología. Alternativamente se han ido desarrollando métodos más invasivos como son la aplicación de implantes corneales intraestromales<sup>115</sup>, queratoplastias lamelares anteriores y queratoplastias penetrantes en casos extremos. Todas estas alternativas van dirigidas a tratar las consecuencias de la enfermedad<sup>246</sup> pero no a tratar la alteración del colágeno que desencadena esa inestabilidad corneal<sup>20, 22</sup>, y ninguna de ellas detiene la progresión de la enfermedad<sup>246</sup>.

El crosslinking del colágeno es un nuevo enfoque para el tratamiento de estas alteraciones corneales. Por medio del uso de la radiación ultravioleta A y un fotomediador (riboflavina, vit. B<sub>2</sub>), se inducen nuevos enlaces covalentes entre las fibras de colágeno que conllevan un incremento de la rigidez del estroma corneal<sup>125</sup>. La inducción

de enlaces entre las fibras de colágeno adyacentes se consigue mediante la fotosensibilización de la riboflavina a través de la radiación de la luz ultravioleta A. La riboflavina se excita generando especies reactivas de oxígeno que son las que inducen esos nuevos puentes covalentes entre los grupos amino de las fibras de colágeno<sup>134</sup>.

La eficacia y seguridad de este nuevo método mínimamente invasivo para corregir la ectasia corneal ha sido el centro de recientes estudios. Muchos trabajos se han basado en pacientes con queratocono mientras que los casos más recientes se han dirigido a las ectasias postquirúrgicas como consecuencia de la cirugía LASIK<sup>35</sup>.

En la esperanza de detener la progresión de las ectasias corneales y de lograr una posible corrección del deterioro refractivo y de la alteración de la estabilidad corneal, se están desarrollando una gran cantidad de estudios en humanos y en modelos animales que van dirigidos a evaluar el tratamiento crosslinking como posible abordaje de la causa subyacente de la ectasia corneal incrementando la rigidez del estroma corneal.

En los trabajos desarrollados en modelo animal encontramos la utilización de la especie porcina (estudios *in vitro* con ojos enucleados)<sup>126, 142, 146, 147, 152, 257, 258</sup> y la especie cunicula<sup>150, 151, 153, 157, 167, 170</sup>. Ambas especies son las seleccionadas para los estudios oftalmológicos dada su semejanza con la especie humana. A tenor de nuestra experiencia en estudios previos con la especie porcina<sup>129</sup>, y tras evaluar las similitudes de la córnea del conejo con la córnea de la especie humana<sup>17</sup>, decidimos escoger la especie cunicula en el presente trabajo para evaluar la efectividad de la técnica crosslinking *in vivo* en córnea sana. En este sentido coincidimos con los estudios realizados por Wollensak *et al* al considerar idónea esta especie para las pruebas básicas de profundidad del tratamiento así como su efecto en el estroma corneal<sup>157</sup>. Cabe destacar que el valor del espesor corneal es importante señalarlo ya que es uno de los indicadores de riesgo para la producción de una ectasia corneal<sup>211</sup>.

El grosor epitelial en la córnea de conejo es de aproximadamente 50-70  $\mu\text{m}$ , siendo muy similar al epitelio corneal de la especie humana. Las únicas diferencias que nos encontramos frente a la córnea humana son la ausencia de membrana de Bowman y la presencia de vasos superficiales en el estroma anterior en el limbo corneal de forma fisiológica<sup>160</sup>. La membrana de Bowman en la especie humana oscila entre 8-14  $\mu\text{m}$  de espesor y, por los estudios recogidos en la bibliografía así como por los resultados del presente estudio, no consideramos que haya sido un factor limitante en el avance y extensión del tratamiento crosslinking a lo largo del estroma corneal.

A mediados del año pasado se descubrió la capa Dua, una capa predescemética, acelular y con un espesor de 10,15 $\pm$ 3,6  $\mu\text{m}$ <sup>15</sup>. En la actualidad, no se encuentran estudios que certifiquen su ausencia o presencia en la córnea de la especie cunicula. No obstante, al ser de localización predescemética no intervendría en el estudio dada la localización anterior de los efectos producidos.

Una de las limitaciones principales de este trabajo es el modelo empleado. Los sujetos utilizados carecen de las condiciones patológicas propias de una ectasia corneal. En la bibliografía consultada no hemos encontrado un modelo de ectasia corneal experimental dado que es una alteración imprevisible en origen, desarrollo y consecuencias, así que se considera un modelo difícilmente reproducible.

Realizamos el protocolo estándar de tratamiento crosslinking de acuerdo con Wollensak *et al*<sup>125, 126, 138</sup> dado que en la mayoría de los estudios consultados utilizan dicho protocolo y los trabajos sobre la no desepitelización corneal o los cambios en tiempo e intensidad de radiación no ofrecen todavía resultados fiables y reproducibles<sup>176, 180, 181, 186, 188-191, 193, 259</sup>, aunque se haya planteado la probabilidad de reducción de las complicaciones postoperatorias<sup>182</sup>. Es por esto por lo que pensamos que para evaluar la efectividad y eficacia de la técnica, como es nuestro caso, creemos esencial basar nuestro estudio en una técnica completamente estandarizada como es el protocolo que se desarrolló

en la Universidad de Dresden<sup>125, 126, 138</sup>, hasta que se realicen más trabajos sobre la seguridad y la efectividad del método transepitelial.

Consideramos la especie cunicula idónea por su fácil manejo y por su forma de estabulación aislada en jaulas con bandejas independientes del lecho de virutas de madera. Además es una especie que tolera bien la sedación ligera con una fácil recuperación así como de esperanza de vida acorde con nuestros estudios sin un incremento de peso considerable. En nuestros estudios anteriores con la especie porcina<sup>129</sup>, apreciamos más limitaciones con el manejo y el comportamiento animal. Consideramos que la estabulación de los animales, así como el adecuado manejo de los mismos, han contribuido a que no se presenten casos de contaminación incluso en los primeros días con la debridación epitelial realizada. En la literatura encontramos diferentes casos de complicaciones tras la aplicación del tratamiento riboflavina/luz UVA que normalmente consisten en aparición de queratitis lamelares difusas, queratitis herpéticas, endotelitis, infiltrados estromales, visión borrosa y fotofobia<sup>200-202, 205, 206</sup>. Estas complicaciones secundarias pueden ser explicadas por otros agentes microbianos concomitantes en la superficie ocular e infección intraoperatoria o postoperatoria temprana.

La debridación puede producir dolor severo y disminución de la visión en los primeros días por lo que para reducir el malestar (RD 53/2013 de 1 de febrero de 2013, B.O.E. nº34 del 8 de febrero) y reducir las posibles complicaciones por infección, encontramos el crosslinking transepitelial más adecuado dado que no hay que realizar la debridación previa<sup>186-189</sup>. La utilización de sustancias como el cloruro de benzalconio, cloruro sódico o sistemas mecánicos (esponja como depósito en el saco conjuntival) para incrementar el tiempo de contacto de la solución de riboflavina pueden ser valorados<sup>183-185</sup>.

La última tendencia de las investigaciones se dirige a la creación de bolsillos intraestromales mediante la utilización del láser femtosegundo<sup>198, 199</sup>

para la administración intraestromal de la solución de riboflavina, aunque creemos que esta modalidad también puede resultar dolorosa para nuestros sujetos, dada la presencia de los nervios en el estroma corneal, además de aumentar el coste de las investigaciones por el uso del femtosegundo.

Dadas las limitaciones en el efecto biomecánico de la modalidad transepitelial podría ser una buena línea de trabajo experimental para conseguir una mayor penetración de la riboflavina y homogeneidad en la misma, que parecen ser los factores claves para esa reducción del efecto biomecánico con respecto al tratamiento crosslinking estándar<sup>185</sup>.

En la bibliografía consultada encontramos diferentes estudios que señalan la aparición de un *haze* como una de las complicaciones más frecuentes de la aplicación del tratamiento crosslinking<sup>207, 209-211, 213</sup>. Los trabajos estudiados refieren que la aparición del *haze* suele darse entre el primer y segundo mes post-crosslinking. En el trabajo de Koller *et al*, encontramos que al mes de la aplicación del crosslinking en los 117 ojos tratados se detecta un *haze* en el estroma anterior que va disminuyendo en grado hasta los 12 meses post-crosslinking<sup>211</sup>. Confirmando el estándar de aparición del *haze*, señalamos el estudio en 40 ojos de 39 pacientes de Mazzotta *et al*, en el que, por medio de la microscopía confocal, señala el hallazgo de *haze* que no afecta a la visión (a una profundidad de 170-200  $\mu\text{m}$ ) en dos pacientes a partir del segundo mes resistente a tratamientos por corticoides<sup>207</sup>.

Centrándonos en los estudios realizados en animales en los que se haya dado este tipo de complicación, encontramos que el grupo de trabajo de la universidad de Dresden refiere en un estudio de 8 conejos de raza Chinchilla la aparición de un edema corneal con *haze* presente hasta los 7 días de realizado el tratamiento crosslinking y que posteriormente se aclara sin tratamiento<sup>157</sup>. Wollensak *et al* describen un marcado edema corneal acompañado de una reacción inflamatoria suave con presencia de macrófagos aislados, linfocitos y neutrófilos<sup>157</sup>.

En este sentido, y a diferencia de los trabajos anteriormente citados, es importante destacar que en el presente trabajo sólo se aprecia la aparición de edema corneal en uno de los individuos del grupo B (seguimiento 3 días postoperatorio). En el estudio histológico de dicho sujeto se puede apreciar la presencia de neutrófilos polimorfonucleares más concentrados en la parte anterior del estroma y de forma aislada a lo largo del resto del estroma, tal y como describen Koller *et al* en su estudio prospectivo sobre complicaciones del tratamiento crosslinking en 117 ojos de la especie humana<sup>211</sup>. Tras evaluar las características de la aparición de *haze* que los autores hacen en sus estudios<sup>157, 207, 209-211</sup>, creemos que este individuo tuvo un edema corneal con presencia de *haze* y un leve infiltrado inflamatorio.

Actualmente se desconoce la causa de esta complicación del tratamiento crosslinking. Mazzotta *et al* ya plantearon la comparación en la especie humana de datos por microscopía confocal pre- y postoperatorios para intentar encontrar una causa morfológica como factor predictivo de esta reacción estromal y si este tipo de complicación se puede considerar un hallazgo normal dada su frecuencia de aparición<sup>207</sup>. De la misma manera, Raiskup *et al*, tras obtener en su estudio un 8,6% de ojos que desarrollan un *haze* permanente (14 ojos de un total de 149 córneas de la especie humana), encuentran una diferencia en el espesor corneal y en los valores queratométricos obtenidos en el preoperatorio del grupo que desarrolla *haze* frente al grupo que mantiene la córnea clara<sup>210</sup>. En el grupo *haze* el espesor corneal es significativamente menor y los valores queratométricos preoperatorios son mayores que en el otro grupo, indicando estos dos factores como posibles factores predictivos del *haze* estromal<sup>210</sup>.

Dado que no hay más estudios al respecto en este sentido, basándonos en estos posibles factores predictivos y analizando en detalle los valores queratométricos preoperatorios de nuestro sujeto ejemplo, no detectamos una diferencia significativa en los valores k, luego no podemos asociar la presencia de *haze* con este factor. Si bien es cierto que en el presente estudio no se han tomado

medidas de paquimetría para evaluar el espesor corneal y no podemos determinar ese otro factor predictivo.

En nuestro anterior estudio en especie porcina sobre la combinación de anillos intracorneales y tratamiento crosslinking<sup>129</sup>, no detectamos en ningún individuo este tipo de complicación del tratamiento crosslinking. Al igual que Wollensak *et al*<sup>157</sup>, consideramos insuficientes los casos detectados en la especie cunícula como para establecer factores predictivos de un desarrollo posterior de *haze* estromal. En este sentido, y dada la escasa bibliografía publicada, no podemos concretar si el desarrollo de esta complicación viene asociado por las características morfológicas de la córnea del individuo o tiene algún otro factor asociado.

En el resto de individuos del estudio no se detecta esta complicación ni ninguna de las otras descritas en la especie humana tales como queratitis herpética, queratitis difusa lamelar, cicatrización anómala en el estroma corneal y *melting*<sup>200-202, 211, 213, 215</sup> en los diferentes tiempos de seguimiento. De igual forma, señalamos que mediante tinción por fluoresceína el epitelio corneal de todos los individuos logra el cierre completo sin signos de úlcera o alteración a los dos días de la aplicación del tratamiento crosslinking, exceptuando al individuo que ha presentado la complicación y que hemos citado anteriormente.

El tiempo de cierre del epitelio presenta la misma duración que los estudios en animales realizados por Wollensak *et al*<sup>151, 157, 170</sup>, confirmando de esta forma la evolución natural de la cicatrización corneal en nuestros individuos.

En referencia al grupo B (seguimiento 3 días), en el cual se detecta el individuo con la complicación ya citada, cabe señalar que, aún siguiendo las mismas pautas que el resto de individuos de ese grupo, manifiesta ese retraso en la cicatrización epitelial. Durante el seguimiento se observa la misma evolución por topografía y queratometría que el resto del grupo así como un aplanamiento corneal, sin que la presencia del *haze* y edema

corneal altere la curvatura. De igual forma este individuo muestra resultados positivos a las pruebas realizadas de visión. Teniendo en cuenta además que todos los individuos integrantes de cada grupo pertenecen a la misma camada, consideramos una de las posibilidades de la aparición de esta reacción de edema corneal así como el retraso en la cicatrización puede deberse a una reacción de hipersensibilidad de tipo individual que pudo haberse estudiado realizando las pruebas correspondientes.

En la bibliografía consultada, hallamos diversos estudios centrados en estudiar la profundidad que alcanza el tratamiento crosslinking en el estroma corneal para evaluar su seguridad con respecto a las otras estructuras corneales tales como membrana de Descemet y endotelio corneal.

En este sentido, Seiler *et al* fueron los pioneros en señalar la profundidad que alcanzaba el tratamiento crosslinking mediante el uso de la lámpara de hendidura<sup>144</sup>. Según sus estudios, describen la aparición de una línea de demarcación a unos 300  $\mu\text{m}$  de profundidad en el estroma de córneas queratócónicas que se hace visible a las dos semanas de la aplicación del tratamiento<sup>144</sup>. Esta línea de demarcación en la especie humana se ha ido confirmando posteriormente en diferentes estudios<sup>123, 145</sup>.

En el presente estudio, y a través del estudio histológico de las muestras corneales de los ojos tratados, hallamos una línea de demarcación clara del tratamiento que alcanza una profundidad de 250  $\pm$  20  $\mu\text{m}$  en el postoperatorio y a los 3 días, dejando de ser visible en el grupo de estudio de 15 días. El uso de los parámetros establecidos por el equipo de investigadores de la Universidad de Dresden<sup>125, 126, 138</sup>, en cuanto a la concentración de riboflavina utilizada y la intensidad de la radiación de luz ultravioleta tipo A emitida, ha establecido una profundidad del tratamiento de 300  $\mu\text{m}$  indicando como factor de riesgo para otras estructuras corneales, y por tanto, factor limitante para la aplicación del tratamiento un espesor corneal mínimo de 400  $\mu\text{m}$  (la media del espesor corneal en la especie humana es de 500-550  $\mu\text{m}$ )<sup>4, 5</sup>. En este estudio no se han realizado medidas del espesor

corneal mediante paquimetría, no obstante la media del espesor corneal es de 450-550  $\mu\text{m}$  en la especie cunicula<sup>3</sup>, por lo que podemos decir que durante la aplicación del tratamiento crosslinking hemos alcanzado una profundidad aproximada del 50% en el estroma corneal (frente al 60% que se alcanza en la especie humana<sup>144</sup>, manteniendo de esta forma intactos la membrana de Descemet y el endotelio corneal.

Un método válido en la actualidad para valorar la profundidad del efecto es la tomografía de coherencia óptica. En su estudio, Kanellopoulos *et al*, evalúan mediante la utilización de la OCT la extensión vertical hasta la línea de demarcación visible que marca la transición entre estroma anterior corneal y posterior no tratado, es decir la profundidad del tratamiento<sup>148</sup>. En su muestra de 94 ojos de la especie humana, con un espesor corneal total de 432  $\mu\text{m}$ , el efecto del tratamiento riboflavina/luz UVA alcanza una extensión de 305,6  $\mu\text{m}$ , lo que corresponde con un 70,98%<sup>148</sup>. La variabilidad de extensión con respecto a nuestros resultados (aproximadamente el 50% de espesor) se explica por la diferencia del espesor corneal en las diferentes especies, que es de 50-100  $\mu\text{m}$ .

A raíz de nuestros resultados, confirmamos el mayor efecto del tratamiento crosslinking en la parte anterior de la córnea, apoyando con estos datos la teoría de la dependencia del efecto del tratamiento en función de la profundidad estromal<sup>126, 138, 144, 146</sup>. En la misma dirección hallamos los estudios experimentales de Kohlhaas<sup>143</sup> sobre córneas porcinas, en los que detalla una profundidad del tratamiento crosslinking de 200  $\mu\text{m}$ . Esta menor profundidad del tratamiento viene determinada por el mayor grosor del estroma corneal en la especie porcina<sup>126</sup> (850  $\mu\text{m}$ ).

Las muestras corneales de los ojos tratados muestran ausencia de queratocitos en el estroma anterior en los dos primeros grupos (postoperatorio y a los 3 días de aplicado el tratamiento). Esta falta de núcleos en el estroma anterior nos señala que el tratamiento crosslinking, a lo largo de su alcance en el estroma anterior, genera una apoptosis de los

queratocitos, cambio que también encontramos publicado por Wollensak *et al* en sus estudios de citotoxicidad sobre diferentes rangos de intensidad de radiación en conejos de raza Neozelandesa<sup>150</sup>. En dicho estudio, detallan la relación dosis/dependiente que tiene la radiación ultravioleta tipo A en el daño a los queratocitos.

En un estudio del año 2006, mediante microscopia confocal en córneas de la especie humana, Caporossi *et al*<sup>145</sup> evidencian un inicio de repoblación de queratocitos en el estroma al mes de la aplicación del tratamiento crosslinking que se completa a los 6 meses, al igual que sucede en el estudio de Mencucci *et al* en el año 2010<sup>172</sup>. En nuestras muestras, se empieza a detectar la aparición de los núcleos de los queratocitos a partir de los 15 días, aumentando la repoblación de estas células en el grupo de 1 mes y estando bastante consolidada en el grupo de 3 meses. En este sentido, podemos considerar que la precocidad de nuestros resultados se debe a la mayor capacidad de regeneración del estroma corneal de la especie cunícula frente a la capacidad de la especie humana.

Consideramos que, en la actualidad, el método de elección para las medidas de la curvatura corneal es la queratometría, sin embargo y dada nuestra experiencia previa<sup>129</sup>, consideramos que presenta determinadas limitaciones. En las córneas muy irregulares, durante la toma de medidas postoperatorias, las miras obtenidas pueden estar muy distorsionadas complicando la toma de datos. Por otro lado, sólo tenemos información de los cuatro puntos centrales de la córnea, sin tener información del resto de la superficie corneal.

Para superar estos límites es de destacar la aportación de la topografía corneal que proporciona una información cualitativa y de utilidad en córneas irregulares.

En la bibliografía consultada, los métodos de evaluación de la superficie corneal, en la especie humana comportan en su mayoría el uso de topografías corneales y obtención de valores k por queratometría, microscopía confocal, lámpara de

hendidura, paquimetría corneal e incluso tomografía de coherencia óptica<sup>148, 169, 171, 181, 194, 200, 211, 219, 228, 232, 242, 260</sup>.

No encontramos estudios en especie cunícula en los que se realice un seguimiento del radio de la superficie anterior de la córnea para evaluar la curvatura. En los trabajos experimentales sobre la utilidad del tratamiento crosslinking en otras alteraciones diferentes a la ectasia corneal, realizados en el animal in vivo, observamos que la mayor parte de los seguimientos consisten en una evaluación limitada al uso de la lámpara de hendidura<sup>244</sup>. En los trabajos experimentales del equipo de la Universidad de Dresden, sobre las consecuencias del tratamiento, incluyen también el uso de la paquimetría corneal para buscar una relación entre el espesor corneal y el efecto producido por la aplicación del tratamiento, si bien cabe señalar que estos estudios se realizan en ojos enucleados de la especie porcina<sup>126</sup>.

En lo referente a la utilización de la queratometría, obtenemos unos valores k en los ojos tratados frente a los valores k obtenidos en el preoperatorio que tienen significación estadística al mes de la aplicación del tratamiento, indicando un mayor aplanamiento corneal respecto al valor preoperatorio en los ojos tratados. A partir de este tiempo y hasta el final del estudio (18 meses), no se produce variación significativa en los radios de la superficie anterior de la córnea. No obstante, cabe señalar que en todos los grupos de estudio la media del radio obtenido al final del estudio es superior a la media del radio preoperatorio, a excepción del grupo postoperatorio. Entendemos que en este último grupo la toma de medidas por queratometría no es del todo fiable, al igual que la topografía corneal, dado que al no haber un epitelio regular debido a la debridación superficial realizada las medidas obtenidas pueden estar muy distorsionadas.

No disponemos de estudios para contrastar los resultados en especie cunícula en los que se realice un seguimiento del radio de la superficie anterior de la córnea para evaluar la curvatura, dado que

los trabajos realizados en animal in vivo están centrados en características específicas del tratamiento crosslinking tales como la modificación en el diámetro de las fibras de colágeno, la variación en la resistencia corneal o la modificación en el comportamiento biomecánico de la córnea<sup>126, 146, 170</sup>, y no en un seguimiento del efecto a largo plazo. Los estudios que encontramos realizados en la especie humana están basados en córneas patológicas, bien por aparición de queratocono<sup>138, 171, 181, 219, 260</sup> o, lo que es más frecuente en la actualidad, por ectasia corneal producida por una cirugía de LASIK previa<sup>203, 232</sup>. En función de los resultados que hemos obtenido y ante la ausencia de documentación al respecto, consideramos importante este estudio dado que establecemos un seguimiento de los efectos del tratamiento crosslinking a nivel de curvatura corneal a diferentes tiempos, con sus diferentes oscilaciones en los valores  $k$  y la evolución corneal de forma cualitativa por topografía. De igual forma, la realización de mapas axiales diferenciales nos permite realizar la observación y el análisis del ojo tratado respecto al preoperatorio. Consideramos que estos datos pueden ser de utilidad para posteriores estudios en animal in vivo, como base descriptiva de las consecuencias de la utilización del tratamiento crosslinking, siempre teniendo presente que se ha realizado en córneas sanas.

En este sentido destacamos que las topografías obtenidas en los estudios postoperatorios, en función de los tiempos definidos, evidencian un aplanamiento de la superficie corneal mayor que el basal del preoperatorio, a excepción del grupo postoperatorio inmediato (grupo A) que ya se ha explicado anteriormente.

En función de los resultados topográficos, los estudios en la especie humana podemos dividirlos en dos grandes subgrupos en función del estado previo de la córnea: ectasia por queratocono o ectasia post-LASIK.

En los resultados obtenidos por examen topográfico en córneas queratocónicas, realizados por Vinciguerra *et al*, encontramos un aplanamiento

de la curvatura corneal respecto al preoperatorio a los 6 meses de aplicado el crosslinking, que sigue siendo mayor y más evidente a los 12 meses<sup>260</sup>. Al igual que estos autores, encontramos otros grupos que documentan de la misma manera un incremento en los valores del radio de la superficie anterior de la córnea normalmente a partir de los 3-6 meses y por tanto un mayor aplanamiento de la superficie corneal<sup>209, 219</sup>. Estos estudios demuestran que el tratamiento no sólo es capaz de frenar el avance del queratocono sino que produce incluso una regresión corneal del mismo. Coincidiendo con estos autores y en función de nuestros resultados, consideramos que el tratamiento crosslinking produce un aplanamiento de la curvatura corneal respecto al valor preoperatorio, si bien es cierto que no podemos valorar la regresión o no, que puede producir en una córnea patológica, dado que no es nuestro caso de estudio al utilizar animales sanos.

El otro subgrupo en el que podemos evaluar la utilidad del tratamiento crosslinking es la ectasia post-Lasik. Hafezi *et al*, en el año 2007, en los resultados topográficos de su estudio en ectasias post-Lasik, señalan un claro aplanamiento de la superficie corneal a los 25 meses de aplicado el tratamiento crosslinking, confirmando de esta forma la capacidad de este tratamiento para frenar el avance de la queratectasia<sup>232</sup>. Al igual que en el caso anterior, este tipo de estudios en la especie humana y nuestros valores, a pesar de ser obtenidos a partir de córneas sanas, nos llevan a sumarnos a la teoría del efecto aplanador del tratamiento crosslinking a nivel del estroma corneal.

Consideramos que hay muchas lagunas en los efectos del tratamiento crosslinking a largo plazo en el estroma corneal. En este sentido, nuestros resultados a los 18 meses nos indican que se mantiene un mayor aplanamiento que el valor preoperatorio (si bien es cierto que no es una diferencia significativa) y no tiene consecuencias a nivel histológico ni alteraciones de la cicatrización, manteniendo el estroma corneal su correcta arquitectura. En la bibliografía consultada encontramos un estudio retrospectivo de una duración de 4 años realizado por el equipo de investigadores de la Universidad de Siena en 44 ojos queratocónicos

de la especie humana<sup>171</sup>. Las medidas en los valores queratométricos y las mejoras topográficas en estos sujetos, se inician a partir del tercer mes post tratamiento crosslinking y alcanzan una estabilidad fiable a los 24 meses en todos los casos. Dicha estabilidad se confirma a los 4 años, sin progresión del queratocono. A pesar de ser escasos los estudios realizados en este sentido, con nuestros resultados a largo plazo creemos que el tratamiento crosslinking mantiene la curvatura de la superficie corneal respecto a los valores iniciales y creemos puede convertirse en una técnica de primera elección debido al mantenimiento prolongado en el tiempo de su efecto aplanador.

Hasta la fecha no hemos encontrado estudios experimentales en modelo animal con evaluación histológica en el postoperatorio inmediato. El estudio experimental que más temprano realiza la evaluación por histología es el realizado por Wollensak *et al*, con muestras del tercer día postoperatorio<sup>157</sup>. En dicho trabajo describen un marcado edema estromal que produce un engrosamiento de la córnea tratada (850 +/- 66  $\mu\text{m}$ ) frente a un grosor de 332 +/- 43  $\mu\text{m}$  de las córneas no tratadas<sup>157</sup>. En nuestro trabajo no hemos realizado estudios de paquimetría para poder evaluar cuantitativamente las variaciones en grosor pero hallamos en las muestras histológicas leves signos de edema corneal en el postoperatorio que se hacen muy evidentes a los 3 días. La presencia de un infiltrado inflamatorio de tipo crónico basado en linfocitos en el área estromal más adyacente al área tratada, así como la aparición de espacios intercelulares y nos sirve como zona de marcación o delimitación del tratamiento que tiene una media de 250 +/- 20  $\mu\text{m}$  de profundidad en los cinco individuos del estudio (grupo postoperatorio y grupo 3 días).

En la especie humana, Wollensak describe una histología de una muestra corneal de un ojo enucleado a las 24 horas de la aplicación del tratamiento crosslinking. Al igual que en nuestro estudio, este autor aprecia una pérdida completa de queratocitos de aproximadamente 250-280  $\mu\text{m}$  y una ausencia de epitelio en la zona central<sup>154</sup>. Este estudio histológico respalda nuestros resultados en cuanto a la profundidad del tratamiento y la seguridad

del endotelio, aunque consideramos necesario obtener estudios a largo plazo para comparar los resultados obtenidos.

En las muestras evaluadas se detecta la repoblación de queratocitos a partir del día 15, a diferencia del estudio de Wollensak *et al* que detallan este hecho en el día 7 post-tratamiento<sup>157</sup>. No podemos concluir el momento exacto del inicio de la repoblación, en nuestro caso, ya que no disponemos de grupo de estudio a los 7 días y puede haberse iniciado la repoblación antes de los 15 días. En lo que sí coincidimos con estos autores es en que la repoblación de este tipo celular en el estroma corneal es prácticamente completa al mes de aplicación del tratamiento. Nuestros estudios continúan más en el tiempo y a los 3 meses este tipo celular ya está consolidado y muestra la arquitectura normal de una córnea sana. En las tinciones de hematoxilina-eosina, podemos apreciar una membrana basal fuerte y un epitelio conformado con sus capas correspondientes, pero no disponemos de información sobre la unión de los hemidesmosomas para valorar la resistencia real de ese epitelio por la falta de estudios ultraestructurales<sup>31</sup> o confocales.

Los efectos que produce el tratamiento sobre las lamelas de colágeno pueden verse reflejados a los 15 días de su aplicación. La disposición ondulada de las lamelas se va reorientando a su posición paralela normal, tal y como describen Akhtar *et al* a nivel estructural<sup>31</sup>, para alcanzar su correcta arquitectura entre los 3 y 6 meses. En su estudio, Akhtar *et al* nos muestran cómo a los 6 meses de la aplicación del tratamiento se aprecian los queratocitos del estroma anterior con un núcleo grande y el resto de orgánulos intracitoplasmáticos en perfecto estado<sup>31</sup>. No disponemos de estudios de microscopía electrónica pero creemos necesario realizar más trabajos en este sentido para poder valorar realmente la recuperación celular.

Nuestros resultados histológicos son similares a lo descrito por Mencucci *et al* que utilizaron la técnica TUNEL para mostrar las células apoptóticas principalmente en la parte anterior del estroma<sup>172</sup>.

Según su estudio a los 6 meses se observa una total repoblación de este tipo celular<sup>172</sup>.

En el presente estudio no hemos realizado conteo de células endoteliales por lo que no podemos aseverar la presencia de un endotelio y una membrana de Descemet intacta. Si bien es cierto, que consideramos que esta circunstancia es poco probable dado que la profundidad que alcanza el tratamiento crosslinking en nuestro caso es aproximadamente del 50% del espesor corneal, y consideramos difícil que la radiación haya podido producir daños en estas estructuras oculares.

A partir de los 3 meses de aplicación del tratamiento y hasta el final de estudio (18 meses) describimos una córnea con una arquitectura correcta por lo que pensamos que la aplicación del tratamiento crosslinking no tiene consecuencias en el retraso de la cicatrización ni alteración en la transparencia corneal. No se registran estudios histológicos en este sentido y en la especie humana sólo se han detectado casos de cicatrización anómala en 4 ojos de un total de 117, que pueden ir asociados a la presencia previa de queratocono aunque no está clara su aparición<sup>202</sup>.

Nuestros estudios se han limitado a la microscopía óptica por tinción de hematoxilina eosina y Rojo Sirio y no hemos realizado estudios de microscopía electrónica que puedan aportarnos datos sobre las variaciones en la cohesión interlamelar de las fibrillas de colágeno. En este sentido creemos necesario realizar trabajos experimentales *in vivo* del efecto a largo plazo del tratamiento crosslinking centrándonos en la estructura propia de las fibras de colágeno y sus uniones, ya que, al igual que otros autores, consideramos que es la base del efecto aplanador del tratamiento crosslinking<sup>125, 146</sup>. Los estudios encontrados en esta dirección también son escasos, *in vitro* y no evalúan esas uniones intercelulares a largo plazo<sup>173</sup>.

Los estudios realizados en modelos animales y en pacientes humanos, indican que los resultados de este tratamiento producen un incremento en la rigidez corneal y una mejora en la agudeza visual.

Con nuestros resultados previos<sup>129</sup>, en combinación con la inserción de anillos intracorneales, y los obtenidos en este estudio consideramos que el tratamiento crosslinking puede ser una técnica de elección para el tratamiento de ectasias corneales puesto que mantiene su efecto aplanador más allá de las técnicas habituales<sup>129</sup>. No obstante, consideramos necesario la realización de más estudios para examinar los efectos del tratamiento en las fibras de colágeno así como otros aspectos de seguridad ocular como puede ser el posible daño a nivel endotelial y la citotoxicidad del tratamiento a nivel celular.

A pesar de las diferencias entre los ojos de la especie humana y la cunicula, nuestros estudios proporcionan importantes conocimientos respecto a estabilidad corneal a largo plazo que hasta ahora se desconocían a nivel experimental. Dados los escasos estudios, creemos que el uso clínico del tratamiento crosslinking se está aplicando sin demasiadas consideraciones en cuanto a consecuencias a largo plazo. Nuestros resultados histológicos validan una estabilidad corneal sin modificaciones a partir de los 3 meses con una arquitectura de córnea sana. De igual modo, aportamos información postoperatoria del efecto crosslinking que puede ser útil para combatir los efectos inmediatos del tratamiento como, dolor postoperatorio por la necrosis subepitelial o el incremento de los espacios interfibrilares que pueden llevar a la producción de edema.

La tendencia a un incremento del radio de la superficie anterior de la córnea, que empieza a observarse a los 15 días de la aplicación del tratamiento, muestra información sobre la rapidez de instauración del tratamiento crosslinking y lo convierte en una herramienta útil para la combinación con otras técnicas, teniendo en cuenta los tiempos de aplicación.

Tras nuestra experiencia con esta innovadora modalidad de tratamiento de las ectasias corneales, consideramos que la combinación riboflavina/luz UVA es uno de los tratamientos más prometedores en el manejo de estos desórdenes dada su capaci-

dad antiedematosa y antiproteolítica, favoreciendo la rigidez de las fibras de colágeno así como su capacidad de reorganización de la arquitectura corneal. Las técnicas usadas hasta la actualidad corrigen el error refractivo que produce la ectasia corneal pero no tratan la causa que la produce ni paran la progresión de la misma.

La asociación de este tratamiento con otras técnicas refractivas (implantación de anillos intracorneales, LASIK, etc.) también está aportando unos resultados para el paciente; en cuanto a mejoría de la agudeza visual así como estabilidad de la patología corneal. Nuestro actual trabajo combinándolo con la queratoplastia conductiva está proporcionando prometedores resultados preliminares en cuanto a la estabilidad corneal y queratometrías. En este estudio además realizamos estudios de paquimetría y microscopía electrónica para solventar las limitaciones que nos hemos ido encontrando en el presente trabajo.

Consideramos que el tratamiento crosslinking además aporta un beneficio social y económico. Es una técnica mínimamente invasiva con un mínimo estrés para el paciente y no necesita hospitalización con la reducción de gastos sanitarios que eso conlleva. No obstante, pese a que son escasas las complicaciones registradas, y en nuestra experiencia la tasa de complicación asciende al 2,8%, consideramos que no es una técnica exenta de riesgos dada la utilización de radiación ultravioleta. Por este motivo creemos necesarios más estudios en esta dirección así como análisis de la capacidad de mantener la estabilidad corneal a largo plazo.

### *Futuras líneas de trabajo*

Creemos necesario la realización de estudios de microscopía electrónica para la valoración de los queratocitos y las uniones entre las lamelas de colágeno y los proteoglicanos a largo plazo para evaluar la estabilidad que conlleva este tratamiento a esos niveles. En la actualidad los estudios a nivel ultraestructural se reducen a un seguimiento a corto y medio plazo o están condicionados por la utilización de la riboflavina transepitelial<sup>186</sup>. La

información que puede proporcionarnos sobre el área de proteoglicanos puede ser interesante dado que los estudios sugieren que el crosslinking también normaliza la síntesis de proteoglicanos y no sólo actúa sobre las lamelas de colágeno<sup>31</sup>. En este sentido, también consideramos interesante la valoración de los nervios presentes en el estroma corneal así como su regeneración para determinar el efecto del tratamiento en la sensibilidad corneal. Según Wasilewski *et al*, la recuperación de dicha sensibilidad se recupera a los 6 meses pero difiere de los valores preoperatorios<sup>162</sup>. De igual modo, se necesitan más estudios en córneas humanas para respaldar los estudios en modelo animal y con largos periodos de seguimientos. Además deben realizarse más trabajos en córneas queratocónicas ya que difieren biomecánicamente de las córneas sanas y se pueden obtener datos más reales de la enfermedad y su estabilización tras el tratamiento.

Una de las líneas de trabajo que consideramos más importante es la evaluación de la seguridad del tratamiento. Hasta la actualidad todos los estudios han ido dirigidos a la valoración del resto de estructuras oculares tales como el cristalino o la retina. Wollensak *et al*, en el año 2011, ya describieron un estudio experimental donde relataron el efecto del crosslinking/UVA en el epitelio limbal y conjuntival<sup>160</sup>. El limbo corneal es una fuente rica en células madres y debe evitarse la radiación accidentalmente. No obstante, en este estudio encontramos un reducido tamaño muestral (3 sujetos de estudio) y solamente 24 horas de seguimiento<sup>160</sup>. Se deben realizar más trabajos para la evaluación de efectos a largo plazo del tratamiento, efectos genotóxicos o mutagénicos así como el umbral de daño del epitelio. En la misma dirección, creemos necesario realizar estudios a largo plazo con contaje y seguimiento de células endoteliales para observar con más detalle la inocuidad de esta monocapa simple. En los últimos años se están registrando varios estudios de posible daño endotelial producido por el efecto crosslinking<sup>216-218</sup>, en los cuales podemos concretar la importancia de un contaje previo de las células endoteliales así como un espesor adecuado. A pesar de seguir todos los criterios que exige el tratamiento crosslinking pueden darse casos de descompensación endotelial

y queratitis que conllevan a una disminución de la agudeza visual.

Otra de las estrategias importantes a seguir, y en la que ya llevamos trabajando dos años, es la asociación de técnicas para lograr el efecto aditivo de las mismas y reducir las limitaciones de cada tratamiento. En nuestra experiencia previa pudimos comprobar (aunque era un tamaño muestral reducido), que la aplicación de riboflavina/luz

UVA aportaba un efecto aditivo aplanador al tratamiento temporal y con reversibilidad de la implantación de Intacs®. Actualmente estamos trabajando en estudio experimental utilizando la combinación de queratoplastia conductiva con el tratamiento crosslinking estándar. Hasta la actualidad los resultados obtenidos nos indican una ligera mejoría en el grupo tratado frente al grupo control, en cuanto a estabilización de la arquitectura y espesor corneal.



## VI. Conclusiones

---

1. La evaluación de los efectos a nivel topográfico han demostrado la efectividad del tratamiento crosslinking a corto, medio y largo plazo expresando un aplanamiento corneal de la superficie ocular estable en el tiempo.
2. Los efectos producidos la técnica de crosslinking a nivel histológico han demostrado que el tratamiento crosslinking mantiene la arquitectura corneal normal sin alteraciones en la cicatrización.
3. La profundidad hasta la que se produce el efecto crosslinking demuestra la seguridad del tratamiento y lo convierte en primera elección para el manejo de las ectasias corneales dentro de los criterios establecidos.



## VII. Resumen

---

Las ectasias son un grupo de trastornos de tipo no inflamatorio generalmente bilaterales, que comparten el adelgazamiento progresivo del espesor y la modificación de la curvatura corneal, dando lugar a una protrusión de la misma. Estos trastornos pueden desencadenarse de modo natural, por un traumatismo ocular o, lo que es más frecuente, como consecuencia de una cirugía refractiva.

Durante la última década el estudio sobre las ectasias corneales ha sufrido un incremento exponencial debido al gran aumento de operaciones de corrección de errores refractivos, tales como la miopía. Todos los trabajos se han centrado en hallar el tratamiento ideal para este tipo de alteraciones ectásicas, pero la mayoría de las técnicas empleadas hasta la fecha son de resultado temporal, ya que no abordan el problema causante de la ectasia sino los síntomas que conlleva su aparición.

Recientemente se ha descrito un procedimiento para aumentar la rigidez corneal que parece no afectar a otras estructuras oculares, mediante la utilización de la riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) y luz ultravioleta tipo A (UVA): el tratamiento crosslinking. Esta técnica se centra directamente en incrementar la rigidez corneal y su resistencia a la ectasia basándose en la inducción de enlaces químicos covalentes uniendo grupos amino de las fibras de colágeno. Existen en la actualidad diversos estudios que han demostrado un aumento en el diámetro de las fibras de colágeno y su resistencia a la digestión por colagenasas, ratificando de esta forma la modificación en la rigidez corneal, producida por esta técnica.

Sin embargo, y a pesar de los resultados satisfactorios de estos estudios realizados por diferentes grupos que están trabajando en esta línea de investigación a nivel mundial, existen algunas lagunas e interrogantes que creemos necesario resolver sobre todo para conseguir una extrapolación al humano sin riesgo alguno. Uno de estos interrogantes que aún está por estudiar son los posibles efectos de esta técnica a largo plazo. Para justificar y dar respuesta a los objetivos planteados hemos realizado un trabajo experimental de 35 conejos machos de la raza Neozelandesa en los que se realiza un debridamiento superficial en ambos ojos. Posteriormente se aplica en uno de los ojos el tratamiento crosslinking y se dividen en 7 grupos aleatoriamente con distintos tiempos de evolución (corto, medio y largo plazo). Realizados los seguimientos mediante queratometrías y topografías corneales y, en función del tiempo asignado a cada grupo, se procede al estudio final y toma de muestras.

Los resultados obtenidos nos indican que la aplicación del tratamiento crosslinking es efectiva ya que se consigue un mayor aplanamiento en el radio de la superficie anterior de la córnea respecto al radio preoperatorio con significación estadística. Por otra parte observamos que a partir de los 3 meses hasta el final de estudio (18 meses) no se produce una modificación significativa en los ojos tratados, si bien observamos un radio ligeramente mayor que el preoperatorio. De igual forma, los estudios histológicos nos muestran que la técnica crosslinking es segura dado que los ojos tratados recuperan su arquitectura normal a partir de los 3 meses, sin alteración en la cicatrización ni aparición de artefactos en el estroma.

A pesar de los resultados prometedores creemos necesario la realización de más estudios para evaluar la cicatrización corneal por microscopía electrónica, analizar la posible toxicidad de la luz ultravioleta en los queratocitos así como la respuesta inmune del organismo a la aplicación de este tratamiento.



## VIII. Summary

---

Corneal ectasia is a generally bilateral, non-inflammatory disorder characterized by progressive corneal thinning with modification to the curvature that causes corneal protrusion. The process may develop spontaneously, secondary to eye trauma or, most commonly, after refractive surgery.

During the last decade, the study of corneal ectasia has increased exponentially due to the widespread use of surgical correction for refractive defects, such as myopia. All these studies focus on finding the optimal therapy for this process; but most techniques used to date offer at most temporary results, because they treat the symptoms, but not the underlying problem causing this disorder.

A new procedure to increase corneal stiffness without affecting other eye structures has been recently described. It involves the use of riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) and ultraviolet light type A (UVA). This technique, known as crosslinking, increases corneal stiffness and resistance to ectasia development by inducing covalent chemical links between amino groups in the collagen fibers. Several current studies performed by different research groups worldwide have shown an increase in diameter of the collagen fibers, as well as increased resistance to collagenase digestion, thus demonstrating this technique to cause a change in corneal stiffness.

However, and despite the promising results yielded by these studies, some questions and gaps in our understanding of the technique remain. These questions should be addressed before safe extrapolation of the procedure to the human being can be attempted. Among these, we have focused on determining long-term effects of the technique. Towards this aim, 35 male New Zealand white rabbits were used in this study. All animals were subjected to a bilateral superficial debridement. Crosslinking technique was then applied in one eye, and animals were randomly divided into 7 groups, that were followed-up for different times. Once the follow-up was completed (keratometry and topography), depending on the animal's study group, final study and sample harvesting were performed.

The results indicate that application of the crosslinking treatment is effective since it achieves a greater flattening of the radius of the anterior surface of the cornea with respect to the preoperative radius (statistical significance). Also note that from the three months to the end of the study (18 months) there is no significant change in the treated eyes, although we observed a slightly larger radius than preoperatively. Likewise, histological studies show that the crosslinking technique is safe because the treated corneas recover their normal architecture at 3 months, without alteration in the healing or artifacts in the stroma.

Despite the positive results we think it is necessary to carry out further studies to evaluate the electron microscopic corneal scarring, the potential toxicity of ultraviolet light on keratocytes and the immune response to the application of this treatment.



## IX. Bibliografía

1. Peiffer R, Pohm-Thorsen L, Corcoran K. Models in ophthalmology and vision research. In: Manning P, Ringler D, Newcomer C, editors. *The biology of the laboratory rabbit*. 2ª ed. San Diego: Academic Press; 1994. p. 409-33.
2. Donnelly TM. Basic anatomy, physiology and husbandry [rabbits]. In: Quesenberry K, Hillyer EV, editors. *Ferrets, rabbits and rodents: clinical medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 147-59.
3. Andrew SE. Corneal diseases of rabbits. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2002;5(2):341-56. Epub 2002/08/13.
4. Iruzubieta J. Concepto de córnea sana. In: Cezón J, editor. *Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el crosslinking*. Sevilla: Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva; 2009. p. 19-34.
5. Rodrigues MM, Waring GO, Hackett J, Donohoo P. Cornea. In: Jakobiec FA, editor. *Ocular Anatomy, Embriology and Teratology*. Philadelphia: Harper and Row; 1982. p. 153-65.
6. Grayson M. Anatomy. In: Grayson M, editor. *Diseases of the cornea*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1985. p. 9-22.
7. Nash IS, Greene PR, Foster CS. Comparison of mechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res*. 1982;35(5):413-24. Epub 1982/11/01.
8. Daxer A, Fratzl P. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implication in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(1):121-9. Epub 1997/01/01.
9. Radner W, Zehetmayer M, Aufreiter R, Mallinger R. Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea. *Cornea*. 1998;17(5):537-43. Epub 1998/10/02.
10. Watsky MT, Olsen TW, Edelhauser HF. Cornea and sclera. In: Tasman W, Jaeger EA, editors. *Duane's Clinical Ophthalmology*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 2005.
11. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(8):2244-58. Epub 1991/07/01.
12. Doughty MJ. The cornea and corneal endothelium in the aged rabbit. *Optom Vis Sci*. 1994;71(12):809-18. Epub 1994/12/01.
13. Edelhauser HF. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. *Cornea*. 2000;19(3):263-73. Epub 2000/06/01.
14. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res*. 1985;4(6):671-8. Epub 1985/06/01.
15. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human Corneal Anatomy Redefined: A Novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778-85. Epub 2013/05/30.
16. Aramberri J, Mendicute J. Queratometría. In: Mendicute J, Aramberri J, Cadarso L, Ruiz M, editors. *Biometría, fórmulas y manejo de la sorpresa refractiva*. Madrid: Editorial Tecnimedia; 2000. p. 57-70.
17. Jue B, Maurice DM. The mechanical properties of the rabbit and human cornea. *J Biomech*. 1986;19(10):847-53. Epub 1986/01/01.
18. Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(4):437-43. Epub 2001/03/27.
19. Foster CS, Yamamoto GK. Ocular rigidity in keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 1978;86(6):802-6. Epub 1978/12/01.
20. Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res*. 1980;31(4):435-41. Epub 1980/10/01.
21. Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res*. 1999;69(5):475-81. Epub 1999/11/05.
22. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998;42(4):297-319. Epub 1998/03/11.
23. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoco-

- nus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol.* 1984;28(4):293-322. Epub 1984/01/01.
24. Binder PS. Ectasia after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(12):2419-29. Epub 2004/01/08.
25. Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, Davison CR, Buckley RJ. Prognostic factors for the progression of keratoconus. *Ophthalmology.* 1994;101(3):439-47. Epub 1994/03/01.
26. Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE, Farjo AA. Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology.* 2006;113(9):1633-8. Epub 2006/07/11.
27. Hollingsworth JG, Bonshek RE, Efron N. Correlation of the appearance of the keratoconic cornea in vivo by confocal microscopy and in vitro by light microscopy. *Cornea.* 2005;24(4):397-405. Epub 2005/04/15.
28. Sherwin T, Brookes NH. Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2004;32(2):211-7. Epub 2004/04/08.
29. Cannon DJ, Foster CS. Collagen crosslinking in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978;17(1):63-5. Epub 1978/01/01.
30. Brookes NH, Loh IP, Clover GM, Poole CA, Sherwin T. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. *Exp Eye Res.* 2003;77(4):515-24. Epub 2003/09/06.
31. Akhtar S, Almubrad T, Paladini I, Mencucci R. Keratoconus corneal architecture after riboflavin/ultraviolet A cross-linking: ultrastructural studies. *Mol Vis.* 2013;19:1526-37. Epub 2013/07/24.
32. Wilson SE, Hong JW. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea.* 2000;19(4):417-20. Epub 2000/08/06.
33. Hollman KW, Emelianov SY, Neiss JH, Jotyán G, Spooner GJ, Juhasz T, et al. Strain imaging of corneal tissue with an ultrasound elasticity microscope. *Cornea.* 2002;21(1):68-73. Epub 2002/01/24.
34. Marchant JK, Zhang G, Birk DE. Association of type XII collagen with regions of increased stability and keratocyte density in the cornea. *Exp Eye Res.* 2002;75(6):683-94. Epub 2002/12/10.
35. Radner W, Zehetmayer M, Skorpik C, Mallinger R. Altered organization of collagen in the apex of keratoconus corneas. *Ophthalmic Res.* 1998;30(5):327-32. Epub 1998/08/15.
36. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Nau CB, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study(a). *Am J Ophthalmol.* 2002;134(5):689-95. Epub 2002/11/14.
37. Cristina Kenney M, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye.* 2003;26(3):139-46. Epub 2005/11/24.
38. Ucakhan OO, Kanpolat A, Yılmaz N, Ozkan M. In vivo confocal microscopy findings in keratoconus. *Eye Contact Lens.* 2006;32(4):183-91. Epub 2006/07/18.
39. Hollingsworth JG, Efron N, Tullo AB. In vivo corneal confocal microscopy in keratoconus. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2005;25(3):254-60. Epub 2005/04/28.
40. Hollingsworth JG, Efron N. Observations of banding patterns (Vogt striae) in keratoconus: a confocal microscopy study. *Cornea.* 2005;24(2):162-6. Epub 2005/02/24.
41. Tsubota K, Yamada M, Naoi S. Specular microscopic observation of human corneal epithelial abnormalities. *Ophthalmology.* 1991;98(2):184-91. Epub 1991/02/01.
42. Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, Kaiya T, Sugar J, Yue BY. Three-dimensional scanning electron microscopic study of keratoconus corneas. *Arch Ophthalmol.* 1998;116(1):62-8. Epub 1998/01/28.
43. Meek KM, Tuft SJ, Huang Y, Gill PS, Hayes S, Newton RH, et al. Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(6):1948-56. Epub 2005/05/26.
44. Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. *Am J Med Genet.* 2000;93(5):403-9. Epub 2000/08/22.
45. Zhou L, Sawaguchi S, Twining SS, Sugar J, Feder RS, Yue BY. Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(7):1117-24. Epub 1998/06/10.
46. Krachmer JH. Eye rubbing can cause keratoconus. *Cornea.* 2004;23(6):539-40. Epub 2004/07/17.
47. Kahan IL, Varsanyi-Nagy M, Toth M, Nadrai A. The possible role of tear fluid thyroxine in kerato-

- conus development. *Exp Eye Res.* 1990;50(4):339-43. Epub 1990/04/01.
48. Caster AI, Trattler W. Corneal ectasia after laser vision correction. *Int Ophthalmol Clin.* 2008;48(1):73-81. Epub 2008/01/23.
49. Binder PS, Lindstrom RL, Stulting RD, Donnenfeld E, Wu H, McDonnell P, et al. Keratoconus and corneal ectasia after LASIK. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31(11):2035-8. Epub 2006/01/18.
50. Barraquer JI. Basis of refractive keratoplasty--1967. *Refract Corneal Surg.* 1989;5(3):179-93. Epub 1989/05/01.
51. Seiler T, Quurke AW. Iatrogenic keratectasia after LASIK in a case of forme fruste keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 1998;24(7):1007-9. Epub 1998/07/31.
52. Rabinowitz YS. Intacs for keratoconus. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007;18(4):279-83. Epub 2007/06/15.
53. Kymionis GD, Siganos CS, Kounis G, Astyrakakis N, Kalyvianaki MI, Pallikaris IG. Management of post-LASIK corneal ectasia with Intacs inserts: one-year results. *Arch Ophthalmol.* 2003;121(3):322-6. Epub 2003/03/06.
54. Guell JL, Velasco F, Sanchez SI, Gris O, Garcia-Rojas M. Intracorneal ring segments after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg.* 2004;20(4):349-55. Epub 2004/08/17.
55. Siganos CS, Kymionis GD, Astyrakakis N, Pallikaris IG. Management of corneal ectasia after laser in situ keratomileusis with INTACS. *J Refract Surg.* 2002;18(1):43-6. Epub 2002/02/07.
56. Randleman JB, Russell B, Ward MA, Thompson KP, Stulting RD. Risk factors and prognosis for corneal ectasia after LASIK. *Ophthalmology.* 2003;110(2):267-75. Epub 2003/02/13.
57. Surgeons ESoCR. European Registry of Quality outcomes for cataract and refractive surgery (Eurequo). Dublin: European Society of Cataract & Refractive Surgeons; 2008 [cited 2013 24 Septiembre 2013]; Available from: <http://www.eurequo.org/new/project.asp>.
58. Lundstrom M, Barry P, Henry Y, Rosen P, Stenevi U. Evidence-based guidelines for cataract surgery: guidelines based on data in the European Registry of Quality Outcomes for Cataract and Refractive Surgery database. *J Cataract Refract Surg.* 2012;38(6):1086-93. Epub 2012/05/01.
59. Kim H, Choi JS, Joo CK. Corneal ectasia after PRK: clinicopathologic case report. *Cornea.* 2006;25(7):845-8. Epub 2006/10/28.
60. Kim H, Song IK, Joo CK. Keratectasia after laser in situ keratomileusis. Clinicopathological case report. *Ophthalmologica.* 2006;220(1):58-64. Epub 2005/12/24.
61. Rabinowitz YS, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in keratoconus. *Refract Corneal Surg.* 1989;5(6):400-8. Epub 1989/11/01.
62. Wilson SE, Lin DT, Klyce SD. Corneal topography of keratoconus. *Cornea.* 1991;10(1):2-8. Epub 1991/01/01.
63. Klein SR, Epstein RJ, Randleman JB, Stulting RD. Corneal ectasia after laser in situ keratomileusis in patients without apparent preoperative risk factors. *Cornea.* 2006;25(4):388-403. Epub 2006/05/04.
64. Abad JC. Idiopathic ectasia after LASIK. *J Refract Surg.* 2006;22(3):230; author reply Epub 2006/04/11.
65. Twa MD, Nichols JJ, Joslin CE, Kollbaum PS, Edrington TB, Bullimore MA, et al. Characteristics of corneal ectasia after LASIK for myopia. *Cornea.* 2004;23(5):447-57. Epub 2004/06/29.
66. Argento C, Cosentino MJ, Tytiun A, Rapetti G, Zarate J. Corneal ectasia after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 2001;27(9):1440-8. Epub 2001/09/22.
67. Comaish IF, Lawless MA. Progressive post-LASIK keratectasia: biomechanical instability or chronic disease process? *J Cataract Refract Surg.* 2002;28(12):2206-13. Epub 2002/12/25.
68. Kamiya K, Miyata K, Tokunaga T, Kiuchi T, Hiraoka T, Oshika T. Structural analysis of the cornea using scanning-slit corneal topography in eyes undergoing excimer laser refractive surgery. *Cornea.* 2004;23(8 Suppl):S59-64. Epub 2004/09/28.
69. Park D, Pérez E, Miller D. Corneal lamellar strength as determined as thickness, position and fibril orientation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:S39.
70. Calossi A. Panorámica general del tratamiento ortoqueratológico. In: Cezón J, editor. *Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el crosslinking.* Sevilla: Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva; 2009. p. 67-75.
71. Matsubara M, Kamei Y, Takeda S, Mukai K,

- Ishii Y, Ito S. Histologic and histochemical changes in rabbit cornea produced by an orthokeratology lens. *Eye Contact Lens*. 2004;30(4):198-204; discussion 5-6. Epub 2004/10/23.
72. Soni PS, Nguyen TT, Bonanno JA. Overnight orthokeratology: refractive and corneal recovery after discontinuation of reverse-geometry lenses. *Eye Contact Lens*. 2004;30(4):254-62; discussion 63-4. Epub 2004/10/23.
73. Swarbrick HA. Orthokeratology review and update. *Clin Exp Optom*. 2006;89(3):124-43. Epub 2006/04/28.
74. Cheah PS, Norhani M, Bariah MA, Myint M, Lye MS, Azian AL. Histomorphometric profile of the corneal response to short-term reverse-geometry orthokeratology lens wear in primate corneas: a pilot study. *Cornea*. 2008;27(4):461-70. Epub 2008/04/25.
75. Terrien F. Dystrophie marginale symétrique de deux cornées avec astigmatisme régulier consécutif et guérison par la cautérisation ignée. *Arch Ophthalmol (Paris)*. 1921;20:12-21.
76. Stringer H, Parr J. Shrinkage Temperature of Eye Collagen. *Nature*. 1964;204:1307. Epub 1964/12/26.
77. Gasset AR, Shaw EL, Kaufman HE, Itoi M, Sakimoto T, Ishii Y. Thermokeratoplasty. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1973;77(4):OP441-54. Epub 1973/07/01.
78. Itoi M. Computer photokeratometry changes following thermokeratoplasty. In: Schachar RA, S. LN, L. S, editors. *Refractive Modulation of the Cornea*. Denison, Texas: LAL Publishers; 1981. p. 61-9.
79. Neumann AC, Sanders DR, Salz JJ. Radial thermokeratoplasty for hyperopia. II. Encouraging results from early laboratory and human trials. *Refract Corneal Surg*. 1989;5(1):50, 2-4. Epub 1989/01/01.
80. Neumann AC, Fyodorov S, Sanders DR. Radial thermokeratoplasty for the correction of hyperopia. *Refract Corneal Surg*. 1990;6(6):404-12. Epub 1990/11/01.
81. Cezón J. Principios básicos de termoqueratoplastia. In: Cezón J, editor. *Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el crosslinking*. Sevilla: Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva; 2009. p. 97-105.
82. Mainster MA. Ophthalmic applications of infrared lasers -- thermal considerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1979;18(4):414-20. Epub 1979/04/01.
83. Chandonnet A, Bazin R, Sirois C, Belanger PA. CO2 laser annular thermokeratoplasty: a preliminary study. *Lasers Surg Med*. 1992;12(3):264-73. Epub 1992/01/01.
84. Bende T, Jean B, Oltrup T. Laser thermal keratoplasty using a continuous wave diode laser. *J Refract Surg*. 1999;15(2):154-8. Epub 1999/04/15.
85. Geerling G, Koop N, Brinkmann R, Tungler A, Wirbelauer C, Birngruber R, et al. Continuous-wave diode laser thermokeratoplasty: first clinical experience in blind human eyes. *J Cataract Refract Surg*. 1999;25(1):32-40. Epub 1999/01/15.
86. Cezón J. Validez de la queratoplastia conductiva como procedimiento refractivo y terapéutico. In: Cezón J, editor. *Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el crosslinking*. Sevilla: Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva; 2009. p. 107-20.
87. Méndez A, Méndez-Noble A. Conductive keratoplasty for the correction of hyperopia. In: Sher N, editor. *Surgery for Hyperopia and Presbyopia*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p. 163-71.
88. Belau PG, Dyer JA, Ogle KN, Henderson JW. Correction of Ametropia with Intracorneal Lenses. An Experimental Study. *Arch Ophthalmol*. 1964;72:541-7. Epub 1964/10/01.
89. Fleming JF, Reynolds AE, Kilmer L. The intrastromal corneal ring. Two cases in rabbits. *J Refract Surg*. 1987;3:227-32.
90. Barraquer RI. Segmentos intracorneales y finalidad refractiva. In: Cezón J, editor. *Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el crosslinking*. Sevilla: Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva; 2009. p. 121-37.
91. Schanzlin DJ, Asbell PA, Burris TE, Durrie DS. The intrastromal corneal ring segments. Phase II results for the correction of myopia. *Ophthalmology*. 1997;104(7):1067-78. Epub 1997/07/01.
92. Alio JL, Shabayek MH, Artola A. Intracorneal ring segments for keratoconus correction: long-term follow-up. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32(6):978-85. Epub 2006/07/04.
93. Chan SM, Khan HN. Reversibility and exchangeability of intrastromal corneal ring segments. *J Cataract Refract Surg*. 2002;28(4):676-81. Epub

2002/04/17.

94. Asbell PA, Ucakhan OO, Abbott RL, Assil KA, Burris TE, Durrie DS, et al. Intrastomal corneal ring segments: reversibility of refractive effect. *J Refract Surg.* 2001;17(1):25-31. Epub 2001/02/24.
95. Siganos D, Ferrara P, Chatzinikolas K, Bessis N, Papastergiou G. Ferrara intrastomal corneal rings for the correction of keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2002;28(11):1947-51. Epub 2002/11/30.
96. Miranda D, Sartori M, Francesconi C, Allemann N, Ferrara P, Campos M. Ferrara intrastomal corneal ring segments for severe keratoconus. *J Refract Surg.* 2003;19(6):645-53. Epub 2003/12/03.
97. Hofling-Lima AL, Branco BC, Romano AC, Campos MQ, Moreira H, Miranda D, et al. Corneal infections after implantation of intracorneal ring segments. *Cornea.* 2004;23(6):547-9. Epub 2004/07/17.
98. Bourcier T, Borderie V, Laroche L. Late bacterial keratitis after implantation of intrastomal corneal ring segments. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(2):407-9. Epub 2003/03/22.
99. Hashemi H, Ghaffari R, Mohammadi M, Moghimi S, Miraftaab M. Microbial keratitis after INTACS implantation with loose suture. *J Refract Surg.* 2008;24(5):551-2. Epub 2008/05/23.
100. Mortensen J, Ohrstrom A. Excimer laser photorefractive keratectomy for treatment of keratoconus. *J Refract Corneal Surg.* 1994;10(3):368-72. Epub 1994/05/01.
101. Mortensen J, Carlsson K, Ohrstrom A. Excimer laser surgery for keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 1998;24(7):893-8. Epub 1998/07/31.
102. Sun R, Gimbel HV, Kaye GB. Photorefractive keratectomy in keratoconus suspects. *J Cataract Refract Surg.* 1999;25(11):1461-6. Epub 1999/11/24.
103. Wilson SE, Kaufman HE. Graft failure after penetrating keratoplasty. *Surv Ophthalmol.* 1990;34(5):325-56. Epub 1990/03/01.
104. Killingsworth DW, Stern GA, Driebe WT, Knapp A, Dragon DM. Results of therapeutic penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1993;100(4):534-41. Epub 1993/04/01.
105. Ibrahim T, Peris C, Menezo JL. Queratoplastia lamelar. In: Peris C, Menezo JL, editors. Tratamiento de la ectasia corneal. Madrid: Sociedad Española de Oftalmología; 2007. p. 177-86.
106. Anwar M, Teichmann KD. Deep lamellar keratoplasty: surgical techniques for anterior lamellar keratoplasty with and without baring of Descemet's membrane. *Cornea.* 2002;21(4):374-83. Epub 2002/04/26.
107. Kirkness CM, Ficker LA, Steele AD, Rice NS. The success of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Eye (Lond).* 1990;4 ( Pt 5):673-88. Epub 1990/01/01.
108. Sugita J, Kondo J. Deep lamellar keratoplasty with complete removal of pathological stroma for vision improvement. *Br J Ophthalmol.* 1997;81(3):184-8. Epub 1997/03/01.
109. Zadok D, Schwarts S, Marcovich A, Barkana Y, Morad Y, Eting E, et al. Penetrating keratoplasty for keratoconus: long-term results. *Cornea.* 2005;24(8):959-61. Epub 2005/10/18.
110. Javadi MA, Motlagh BF, Jafarinasab MR, Rabbanihah Z, Anissian A, Souri H, et al. Outcomes of penetrating keratoplasty in keratoconus. *Cornea.* 2005;24(8):941-6. Epub 2005/10/18.
111. Colin J, Cochener B, Savary G, Malet F, Holmes-Higgin D. INTACS inserts for treating keratoconus: one-year results. *Ophthalmology.* 2001;108(8):1409-14. Epub 2001/07/27.
112. Kanellopoulos AJ, Pe LH, Perry HD, Donnenfeld ED. Modified intracorneal ring segment implantations (INTACS) for the management of moderate to advanced keratoconus: efficacy and complications. *Cornea.* 2006;25(1):29-33. Epub 2005/12/07.
113. Colin J, Malet FJ. Intacs for the correction of keratoconus: two-year follow-up. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(1):69-74. Epub 2006/12/27.
114. Shetty R, Kurian M, Anand D, Mhaske P, Narayana KM, Shetty BK. Intacs in advanced keratoconus. *Cornea.* 2008;27(9):1022-9. Epub 2008/09/25.
115. Ertan A, Colin J. Intracorneal rings for keratoconus and keratectasia. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(7):1303-14. Epub 2007/06/26.
116. Lovisoló CF, Mularoni A, Mazzolani F. Combinación de la implantación de INTACS con otros procedimientos refractivos o no refractivos. In: Cezón J, editor. Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el crosslinking. Sevilla: Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva; 2009. p. 145-62.
117. Ertan A, Kamburoglu G, Bahadir M. Intacs

- insertion with the femtosecond laser for the management of keratoconus: one-year results. *J Cataract Refract Surg.* 2006;32(12):2039-42. Epub 2006/12/02.
118. Ertan A, Kamburoglu G. Analysis of centration of Intacs segments implanted with a femtosecond laser. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(3):484-7. Epub 2007/02/27.
119. Swarbrick HA. Orthokeratology (corneal refractive therapy): what is it and how does it work? *Eye Contact Lens.* 2004;30(4):181-5; discussion 205-6. Epub 2004/10/23.
120. Mansour AM, Haddad RS. Corneal topography after ocular rubbing. *Cornea.* 2002;21(8):756-8. Epub 2002/11/01.
121. Calossi A, Romano F, Ferraioli G, Romano V. Orthokeratology and riboflavin-UVA corneal collagen crosslinking in keratoconus. *J Emmetropia.* 2010;1:126-31.
122. Arriola-Villalobos P, Diaz-Valle D, Guell JL, Iradier-Urrutia MT, Jimenez-Alfaro I, Cuina-Sardina R, et al. Intrastromal corneal ring segment implantation for high astigmatism after penetrating keratoplasty. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(11):1878-84. Epub 2009/11/03.
123. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea.* 2007;26(4):385-9. Epub 2007/04/26.
124. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg.* 2008;34(5):796-801. Epub 2008/05/13.
125. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol.* 2006;17(4):356-60. Epub 2006/08/11.
126. 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(9):1780-5. Epub 2003/10/03.
127. Chan CC, Sharma M, Wachler BS. Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(1):75-80. Epub 2006/12/27.
128. Vicente LL, S. BWB. Factors that correlate with improvement in vision after combined Intacs and trans-epithelial corneal crosslinking. *Br J Ophthalmol.* 2010;94(12):1597-601.
129. Abellán E, Calles C, Cadarso L, Sánchez FM. Tratamientos combinados. Estudio experimental en córnea porcina sobre el efecto combinado de crosslinking e Intacs. In: Cezón J, editor. *Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el crosslinking.* Sevilla: Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva; 2009. p. 434-7.
130. Ertan A, Karacal H, Kamburoglu G. Refractive and topographic results of transepithelial cross-linking treatment in eyes with intacs. *Cornea.* 2009;28(7):719-23. Epub 2009/07/04.
131. Kymionis GD, Portaliou DM, Kounis GA, Limnopoulou AN, Kontadakis GA, Grentzelos MA. Simultaneous topography-guided photorefractive keratectomy followed by corneal collagen cross-linking for keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2011;152(5):748-55. Epub 2011/07/29.
132. Iseli H, Hafezi F, Mrochen M. Estado actual de la reticulación del colágeno corneal. In: Cezón J, editor. *Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el Crosslinking.* Sevilla: Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva; 2009. p. 387-92.
133. Malik NS, Moss SJ, Ahmed N, Furth AJ, Wall RS, Meek KM. Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1138(3):222-8. Epub 1992/03/20.
134. Seiler T, Huhle S, Spoerl E, Kunath H. Manifest diabetes and keratoconus: a retrospective case-control study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2000;238(10):822-5. Epub 2000/12/29.
135. de Gee AJ, Leloup G, Werner A, Vreven J, Davidson CL. Structural integrity of resin-modified glass ionomers as affected by the delay or omission of light activation. *J Dent Res.* 1998;77(8):1658-63. Epub 1998/08/27.
136. Melan MA. Overview of cell fixation and permeabilization. *Methods Mol Biol.* 1994;34:55-66. Epub 1994/01/01.
137. Jayakrishnan A, Jameela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials.* 1996;17(5):471-84. Epub 1996/03/01.
138. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.*

2003;135(5):620-7. Epub 2003/04/30.

139. Pouliquen Y, Graf B, de Kozak Y, Bisson J, Faure JP. [Morphological study of keratoconus]. *Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol.* 1970;30(6-7):497-532. Epub 1970/06/01. Etude morphologique du keratocone.

140. Iwamoto T, Devoe AG. Particulate structures in keratoconus. *Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol.* 1975;35(1):65-76. Epub 1975/01/01.

141. McTigue JW. The human cornea: a light and electron microscopic study of the normal cornea and its alterations in various dystrophies. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1967;65:591-660. Epub 1967/01/01.

142. Spoerl E, Wollensak G, Dittert DD, Seiler T. Thermomechanical behavior of collagen-cross-linked porcine cornea. *Ophthalmologica.* 2004;218(2):136-40. Epub 2004/03/09.

143. Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Wittig C, Pillunat LE. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg.* 2006;32(2):279-83. Epub 2006/03/28.

144. Seiler T, Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. *Cornea.* 2006;25(9):1057-9. Epub 2006/11/30.

145. Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C, Traversi C, Caporossi T. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study. *J Cataract Refract Surg.* 2006;32(5):837-45. Epub 2006/06/13.

146. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res.* 2004;29(1):35-40. Epub 2004/09/17.

147. Wollensak G, Aurich H, Pham DT, Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(3):516-21. Epub 2007/02/27.

148. Kanellopoulos AJ, Asimellis G. Introduction of quantitative and qualitative cornea optical coherence tomography findings induced by collagen cross-linking for keratoconus: a novel effect measurement benchmark. *Clin Ophthalmol.* 2013;7:329-35. Epub 2013/02/27.

149. Kanellopoulos AJ. Long term results of a prospective randomized bilateral eye comparison

trial of higher fluence, shorter duration ultraviolet A radiation, and riboflavin collagen cross linking for progressive keratoconus. *Clin Ophthalmol.* 2012;6:97-101. Epub 2012/01/26.

150. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea.* 2004;23(1):43-9. Epub 2004/01/01.

151. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye (Lond).* 2004;18(7):718-22. Epub 2004/01/24.

152. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Pillunat L, Funk R. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res.* 2003;35(6):324-8. Epub 2003/12/23.

153. 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(9):1786-90. Epub 2003/10/03.

154. Wollensak G. Histological changes in human cornea after cross-linking with riboflavin and ultraviolet A. *Acta Ophthalmol.* 2010;88(2):e17-8. Epub 2009/05/13.

155. Goldich Y, Marcovich AL, Barkana Y, Avni I, Zadok D. Safety of corneal collagen cross-linking with UV-A and riboflavin in progressive keratoconus. *Cornea.* 2010;29(4):409-11. Epub 2010/02/19.

156. Ringvold A, Davanger M, Olsen EG. Changes of the cornea endothelium after ultraviolet radiation. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1982;60(1):41-53. Epub 1982/02/01.

157. Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, Herbst H. Wound healing in the rabbit cornea after corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA. *Cornea.* 2007;26(5):600-5. Epub 2007/05/26.

158. Cullen AP, Chou BR, Hall MG, Jany SE. Ultraviolet-B damages corneal endothelium. *Am J Optom Physiol Opt.* 1984;61(7):473-8. Epub 1984/07/01.

159. Riley MV, Susan S, Peters MI, Schwartz CA. The effects of UV-B irradiation on the corneal endothelium. *Curr Eye Res.* 1987;6(8):1021-33. Epub 1987/08/01.

160. Wollensak G, Mazzotta C, Kalinski T, Sel S. Limbal and conjunctival epithelium after corneal cross-linking using riboflavin and UVA. *Cornea.* 2011;30(12):1448-54. Epub 2011/10/01.

161. Leccisotti A, Islam T. Transepithelial corneal collagen cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg.* 2010;26(12):942-8. Epub 2010/02/20.
162. Wasilewski D, Mello GH, Moreira H. Impact of collagen crosslinking on corneal sensitivity in keratoconus patients. *Cornea.* 2013;32(7):899-902. Epub 2012/12/25.
163. Cezón J. Seguridad en la aplicación de radiación ultravioleta en el procedimiento de crosslinking del colágeno corneal. In: Cezón J, editor. *Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el crosslinking.* Sevilla: Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva; 2009. p. 393-8.
164. Mencucci R, Ambrosini S, Ponchietti C, Marini M, Vannelli GB, Menchini U. Ultrasound thermal damage to rabbit corneas after simulated phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg.* 2005;31(11):2180-6. Epub 2006/01/18.
165. Corvi A, Innocenti B, Mencucci R. Thermography used for analysis and comparison of different cataract surgery procedures based on phacoemulsification. *Physiol Meas.* 2006;27(4):371-84. Epub 2006/03/16.
166. Mencucci R, Mazzotta C, Rossi F, Ponchietti C, Pini R, Baiocchi S, et al. Riboflavin and ultraviolet A collagen crosslinking: in vivo thermographic analysis of the corneal surface. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(6):1005-8. Epub 2007/05/29.
167. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta Ophthalmol.* 2009;87(1):48-51. Epub 2008/06/13.
168. Carlson EC, Waring GO, 3rd. Ultrastructural analyses of enzyme-treated microfibrils in rabbit corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(4):578-85. Epub 1988/04/01.
169. Ehlers N, Hjortdal J, Nielsen K, Sondergaard A. Riboflavin-UVA treatment in the management of edema and nonhealing ulcers of the cornea. *J Refract Surg.* 2009;25(9):S803-6. Epub 2009/09/24.
170. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea.* 2004;23(5):503-7. Epub 2004/06/29.
171. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T. Long-term results of riboflavin ultraviolet a corneal collagen cross-linking for keratoconus in Italy: the Siena eye cross study. *Am J Ophthalmol.* 2010;149(4):585-93. Epub 2010/02/09.
172. Mencucci R, Marini M, Paladini I, Sarchielli E, Sgambati E, Menchini U, et al. Effects of riboflavin/UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2010;38(1):49-56. Epub 2010/05/08.
173. Wollensak G, Spoerl E, Mazzotta C, Kalinski T, Sel S. Interlamellar cohesion after corneal crosslinking using riboflavin and ultraviolet A light. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(6):876-80. Epub 2011/03/02.
174. McCall AS, Kraft S, Edelhauser HF, Kidder GW, Lundquist RR, Bradshaw HE, et al. Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(1):129-38. Epub 2009/08/01.
175. Iseli HP, Popp M, Seiler T, Spoerl E, Mrochen M. Laboratory measurement of the absorption coefficient of riboflavin for ultraviolet light (365 nm). *J Refract Surg.* 2011;27(3):195-201. Epub 2010/09/30.
176. Spoerl E, Hoyer A, Pillunat LE, Raiskup F. Corneal cross-linking and safety issues. *Open Ophthalmol J.* 2011;5:14-6. Epub 2011/03/15.
177. Samaras K, O'Brart D P, Douth J, Hayes S, Marshall J, Meek KM. Effect of epithelial retention and removal on riboflavin absorption in porcine corneas. *J Refract Surg.* 2009;25(9):771-5. Epub 2009/09/24.
178. Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Sel S. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2010;36(1):114-20. Epub 2010/02/02.
179. Kapasi M, Baath J, Mintsoulis G, Jackson WB, Baig K. Phototherapeutic keratectomy versus mechanical epithelial removal followed by corneal collagen crosslinking for keratoconus. *Can J Ophthalmol.* 2012;47(4):344-7. Epub 2012/08/14.
180. Wollensak G, Iomdina E. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(3):540-6. Epub 2009/03/03.
181. Spadea L, Mencucci R. Transepithelial corneal collagen cross-linking in ultrathin keratoconic corneas. *Clin Ophthalmol.* 2012;6:1785-92. Epub 2012/11/16.
182. Hovakimyan M, Guthoff RF, Stachs O. Collagen cross-linking: current status and future directions. *J Ophthalmol.* 2012;2012:406850. Epub 2012/01/31.

183. Kissner A, Spoerl E, Jung R, Spekl K, Pillunat LE, Raiskup F. Pharmacological modification of the epithelial permeability by benzalkonium chloride in UVA/Riboflavin corneal collagen cross-linking. *Curr Eye Res.* 2010;35(8):715-21. Epub 2010/08/03.
184. Raiskup F, Pinelli R, Spoerl E. Riboflavin osmolar modification for transepithelial corneal cross-linking. *Curr Eye Res.* 2012;37(3):234-8. Epub 2012/02/18.
185. Stojanovic A, Chen X, Jin N, Zhang T, Stojanovic F, Raeder S, et al. Safety and efficacy of epithelium-on corneal collagen cross-linking using a multifactorial approach to achieve proper stromal riboflavin saturation. *J Ophthalmol.* 2012;2012:498435. Epub 2012/08/18.
186. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T, Paradiso AL. Transepithelial corneal collagen crosslinking for keratoconus: qualitative investigation by in vivo HRT II confocal analysis. *Eur J Ophthalmol.* 2012;22 Suppl 7:S81-8. Epub 2012/02/22.
187. Mencucci R, Paladini I, Sarchielli E, Favuzza E, Vannelli GB, Marini M. Transepithelial riboflavin/ultraviolet. a corneal cross-linking in keratoconus: morphologic studies on human corneas. *Am J Ophthalmol.* 2013;156(5):874-84 e1. Epub 2013/08/27.
188. Filippello M, Stagni E, O'Brart D. Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study. *J Cataract Refract Surg.* 2012;38(2):283-91. Epub 2011/11/23.
189. Filippello M, Stagni E, Buccoliero D, Bonfiglio V, Avitabile T. Transepithelial cross-linking in keratoconus patients: confocal analysis. *Optom Vis Sci.* 2012;89(10):e1-7. Epub 2012/09/04.
190. Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, Caporossi T, Caporossi A. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(5):893-9. Epub 2009/04/28.
191. Caporossi A, Mazzotta C, Paradiso AL, Baiocchi S, Marigliani D, Caporossi T. Transepithelial corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus: 24-month clinical results. *J Cataract Refract Surg.* 2013;39(8):1157-63. Epub 2013/06/25.
192. Bottos KM, Dreyfuss JL, Regatieri CV, Lima-Filho AA, Schor P, Nader HB, et al. Immunofluorescence confocal microscopy of porcine corneas following collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A. *J Refract Surg.* 2008;24(7):S715-9. Epub 2008/09/25.
193. Hayes S, O'Brart DP, Lamdin LS, Douth J, Samaras K, Marshall J, et al. Effect of complete epithelial debridement before riboflavin-ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy. *J Cataract Refract Surg.* 2008;34(4):657-61. Epub 2008/03/26.
194. Hafezi F, Mrochen M, Iseli HP, Seiler T. Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(4):621-4. Epub 2009/03/24.
195. Hafezi F. Limitation of collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution: failure in an extremely thin cornea. *Cornea.* 2011;30(8):917-9. Epub 2011/03/11.
196. Raiskup F, Spoerl E. Corneal cross-linking with hypo-osmolar riboflavin solution in thin keratoconic corneas. *Am J Ophthalmol.* 2011;152(1):28-32 e1. Epub 2011/05/03.
197. Kilic A, Kamburoglu G, Akinci A. Riboflavin injection into the corneal channel for combined collagen crosslinking and intrastromal corneal ring segment implantation. *J Cataract Refract Surg.* 2012;38(5):878-83. Epub 2012/03/20.
198. Kanellopoulos AJ. Collagen cross-linking in early keratoconus with riboflavin in a femtosecond laser-created pocket: initial clinical results. *J Refract Surg.* 2009;25(11):1034-7. Epub 2009/09/08.
199. Wollensak G, Hammer CM, Sporl E, Klenke J, Skerl K, Zhang Y, et al. Biomechanical efficacy of collagen crosslinking in porcine cornea using a femtosecond laser pocket. *Cornea.* 2014;33(3):300-5. Epub 2014/01/25.
200. Kymionis GD, Portaliou DM, Bouzoukis DI, Suh LH, Pallikaris AI, Markomanolakis M, et al. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(11):1982-4. Epub 2007/10/30.
201. Kymionis GD, Bouzoukis DI, Diakonidis VF, Portaliou DM, Pallikaris AI, Yoo SH. Diffuse lamellar keratitis after corneal crosslinking in a patient with post-laser in situ keratomileusis corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(12):2135-7. Epub 2007/12/07.
202. Koppen C, Vryghem JC, Gobin L, Tassignon MJ. Keratitis and corneal scarring after UVA/riboflavin cross-linking for keratoconus. *J Refract Surg.*

- 2009;25(9):S819-23. Epub 2009/09/24.
203. Salgado JP, Khoramnia R, Lohmann CP, Winkler von Mohrenfels C. Corneal collagen crosslinking in post-LASIK keratectasia. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(4):493-7. Epub 2010/08/04.
204. Kymionis GD, Portaliou DM, Pallikaris IG. Additional complications of corneal crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2010;36(1):185; author reply 6. Epub 2010/02/02.
205. Perez-Santonja JJ, Artola A, Javaloy J, Alio JL, Abad JL. Microbial keratitis after corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(6):1138-40. Epub 2009/05/26.
206. Arora R, Jain P, Gupta D, Goyal JL. Sterile keratitis after corneal collagen crosslinking in a child. *Cont Lens Anterior Eye.* 2012;35(5):233-5. Epub 2012/07/13.
207. Mazzotta C, Balestrazzi A, Baiocchi S, Traversi C, Caporossi A. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: in vivo confocal microscopic evaluation. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007;35(6):580-2. Epub 2007/09/01.
208. Carr JD, Patel R, Hersh PS. Management of late corneal haze following photorefractive keratectomy. *J Refract Surg.* 1995;11(3 Suppl):S309-13. Epub 1995/05/01.
209. Hafezi F, Koller T, Vinciguerra P, Seiler T. Marked remodelling of the anterior corneal surface following collagen cross-linking with riboflavin and UVA. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(8):1171-2. Epub 2010/10/12.
210. Raiskup F, Hoyer A, Spoerl E. Permanent corneal haze after riboflavin-UVA-induced cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg.* 2009;25(9):S824-8. Epub 2009/09/24.
211. Koller T, Mrochen M, Seiler T. Complication and failure rates after corneal crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(8):1358-62. Epub 2009/07/28.
212. Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi T, Tommasi C, et al. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea.* 2007;26(4):390-7. Epub 2007/04/26.
213. Dhawan S, Rao K, Natrajan S. Complications of corneal collagen cross-linking. *J Ophthalmol.* 2011;2011:869015. Epub 2012/01/19.
214. Greenstein SA, Hersh PS. Characteristics influencing outcomes of corneal collagen crosslinking for keratoconus and ectasia: Implications for patient selection. *J Cataract Refract Surg.* 2013;39(8):1133-40. Epub 2013/07/31.
215. Labiris G, Kaloghianni E, Koukoula S, Zissimopoulos A, Kozobolis VP. Corneal melting after collagen cross-linking for keratoconus: a case report. *J Med Case Rep.* 2011;5:152. Epub 2011/04/19.
216. Gokhale NS. Corneal endothelial damage after collagen cross-linking treatment. *Cornea.* 2011;30(12):1495-8. Epub 2011/10/18.
217. Bagga B, Pahuja S, Murthy S, Sangwan VS. Endothelial failure after collagen cross-linking with riboflavin and UV-A: case report with literature review. *Cornea.* 2012;31(10):1197-200. Epub 2012/09/11.
218. Lange C, Bohringer D, Reinhard T. Corneal endothelial loss after crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012;250(11):1689-91. Epub 2012/08/08.
219. Derakhshan A, Shandiz JH, Ahadi M, Daneshvar R, Esmaily H. Short-term Outcomes of Collagen Crosslinking for Early Keratoconus. *J Ophthalmic Vis Res.* 2011;6(3):155-9. Epub 2012/03/29.
220. Sloot F, Soeters N, van der Valk R, Tahzib NG. Effective corneal collagen crosslinking in advanced cases of progressive keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2013;39(8):1141-5. Epub 2013/05/29.
221. Arora R, Jain P, Goyal JL, Gupta D. Comparative Analysis of Refractive and Topographic Changes in Early and Advanced Keratoconic Eyes Undergoing Corneal Collagen Crosslinking. *Cornea.* 2013. Epub 2013/08/27.
222. Poli M, Cornut PL, Balmitgere T, Aptel F, Janin H, Burillon C. Prospective study of corneal collagen cross-linking efficacy and tolerance in the treatment of keratoconus and corneal ectasia: 3-year results. *Cornea.* 2013;32(5):583-90. Epub 2012/10/23.
223. Reeves SW, Stinnett S, Adelman RA, Afshari NA. Risk factors for progression to penetrating keratoplasty in patients with keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2005;140(4):607-11. Epub 2005/10/18.

224. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T, Denaro R. Age-Related Long-Term Functional Results after Riboflavin UV A Corneal Cross-Linking. *J Ophthalmol.* 2011;2011:608041. Epub 2011/08/13.
225. Salman AG. Transepithelial corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus in a pediatric age group. *J Cataract Refract Surg.* 2013;39(8):1164-70. Epub 2013/06/25.
226. Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ, Snibson GR. A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results. *J Refract Surg.* 2008;24(7):S720-5. Epub 2008/09/25.
227. Coskunseven E, Jankov MR, 2nd, Hafezi F. Contralateral eye study of corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA irradiation in patients with keratoconus. *J Refract Surg.* 2009;25(4):371-6. Epub 2009/05/13.
228. Hafezi F, Dejica P, Majo F. Modified corneal collagen crosslinking reduces corneal oedema and diurnal visual fluctuations in Fuchs dystrophy. *Br J Ophthalmol.* 2010;94(5):660-1. Epub 2010/05/08.
229. Kymionis GD, Karavitaki AE, Kounis GA, Portaliou DM, Yoo SH, Pallikaris IG. Management of pellucid marginal corneal degeneration with simultaneous customized photorefractive keratectomy and collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(7):1298-301. Epub 2009/06/24.
230. Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Pham DT. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy. *Ophthalmic Res.* 2009;41(2):114-7. Epub 2009/01/06.
231. Kozobolis V, Labiris G, Gkika M, Sideroudi H, Kaloghianni E, Papadopoulou D, et al. UV-A Collagen Cross-Linking Treatment of Bullous Keratopathy Combined With Corneal Ulcer. *Cornea.* 2010;29(2):235-8. Epub 2009/12/22.
232. Hafezi F, Kanellopoulos J, Wiltfang R, Seiler T. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(12):2035-40. Epub 2007/12/07.
233. Li G, Fan ZJ, Peng XJ. Corneal collagen crosslinking for corneal ectasia of post-LASIK: one-year results. *Int J Ophthalmol.* 2012;5(2):190-5. Epub 2012/07/05.
234. Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, Salamatina O, Stoltenburg G. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005;83(4):477-82. Epub 2005/07/21.
235. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA). *Acta Ophthalmol.* 2009;87(2):193-8. Epub 2008/09/23.
236. Kampik D, Ralla B, Keller S, Hirschberg M, Friedl P, Geerling G. Influence of corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-a irradiation on excimer laser surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(8):3929-34. Epub 2010/03/09.
237. Kanellopoulos AJ. Long-term safety and efficacy follow-up of prophylactic higher fluence collagen cross-linking in high myopic laser-assisted in situ keratomileusis. *Clin Ophthalmol.* 2012;6:1125-30. Epub 2012/08/14.
238. Kanellopoulos AJ, Kahn J. Topography-guided hyperopic LASIK with and without high irradiance collagen cross-linking: initial comparative clinical findings in a contralateral eye study of 34 consecutive patients. *J Refract Surg.* 2012;28(11 Suppl):S837-40. Epub 2013/03/02.
239. Celik HU, Alagoz N, Yildirim Y, Agca A, Marshall J, Demirok A, et al. Accelerated corneal crosslinking concurrent with laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 2012;38(8):1424-31. Epub 2012/07/21.
240. Anwar HM, El-Danasoury AM, Hashem AN. Corneal collagen crosslinking in the treatment of infectious keratitis. *Clin Ophthalmol.* 2011;5:1277-80. Epub 2011/10/04.
241. Makdoui K, Mortensen J, Sorkhabi O, Malmvall BE, Crafoord S. UVA-riboflavin photochemical therapy of bacterial keratitis: a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012;250(1):95-102. Epub 2011/08/30.
242. Abbouda A, Estrada AV, Rodriguez AE, Alio JL. Anterior segment optical coherence tomography in evaluation of severe fungal keratitis infections treated by corneal crosslinking. *Eur J Ophthalmol.* 2014;0. Epub 2014/01/30.
243. Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, Kampmeier J, Seiler T. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea.* 2008;27(5):590-4. Epub 2008/06/04.
244. Gao XW, Zhao XD, Li WJ, Zhou X, Liu Y. Experimental study on the treatment of rabbit

- corneal melting after alkali burn with Collagen cross-linking. *Int J Ophthalmol*. 2012;5(2):147-50. Epub 2012/07/05.
245. Said DG, Elalfy MS, Gatzoufas Z, El-Zakzouk ES, Hassan MA, Saif MY, et al. Collagen Cross-Linking with Photoactivated Riboflavin (PACK-CXL) for the Treatment of Advanced Infectious Keratitis with Corneal Melting. *Ophthalmology*. 2014. Epub 2014/03/01.
246. Tomkins O, Garzosi HJ. Collagen cross-linking: Strengthening the unstable cornea. *Clin Ophthalmol*. 2008;2(4):863-7. Epub 2009/08/12.
247. Calossi A, Romano F, Ferraioli G. Orthokeratology and riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus. *J Emmetropia*. 2010;1(3):126-31.
248. Kanellopoulos AJ. The management of cornea blindness from severe corneal scarring, with the Athens Protocol (transepithelial topography-guided PRK therapeutic remodeling, combined with same-day, collagen cross-linking). *Clin Ophthalmol*. 2012;6:87-90. Epub 2012/02/22.
249. Kanellopoulos AJ, Binder PS. Management of corneal ectasia after LASIK with combined, same-day, topography-guided partial transepithelial PRK and collagen cross-linking: the athens protocol. *J Refract Surg*. 2011;27(5):323-31. Epub 2010/12/02.
250. Kymionis GD, Kankariya VP, Kontadakis GA. Combined treatment with flap amputation, phototherapeutic keratectomy, and collagen crosslinking in severe intractable post-LASIK atypical mycobacterial infection with corneal melt. *J Cataract Refract Surg*. 2012;38(4):713-5. Epub 2012/03/01.
251. Kremer I, Aizenman I, Lichter H, Shayer S, Levinger S. Simultaneous wavefront-guided photorefractive keratectomy and corneal collagen crosslinking after intrastromal corneal ring segment implantation for keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2012;38(10):1802-7. Epub 2012/08/04.
252. Cakir H, Pekel G, Perente I, Genc S. Comparison of intrastromal corneal ring segment implantation only and in combination with collagen crosslinking for keratoconus. *Eur J Ophthalmol*. 2013;23(5):629-34. Epub 2013/03/14.
253. Yeung SN, Low SA, Ku JY, Lichtinger A, Kim P, Teichman J, et al. Transepithelial phototherapeutic keratectomy combined with implantation of a single inferior intrastromal corneal ring segment and collagen crosslinking in keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2013;39(8):1152-6. Epub 2013/05/28.
254. al crosslinking to prevent hyperopic LASIK regression. *Clin Ophthalmol*. 2013;7:637-41. Epub 2013/04/12.
255. Ahearne M, Yang Y, Then KY, Liu KK. Non-destructive mechanical characterisation of UVA/riboflavin crosslinked collagen hydrogels. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(2):268-71. Epub 2007/12/07.
256. Kenney MC, Chwa M, Opbroek AJ, Brown DJ. Increased gelatinolytic activity in keratoconus keratocyte cultures. A correlation to an altered matrix metalloproteinase-2/tissue inhibitor of metalloproteinase ratio. *Cornea*. 1994;13(2):114-24. Epub 1994/03/01.
257. Kohnen T. Riboflavin-UVA corneal collagen crosslinking as an evolving surgical procedure for progressive ophthalmic tissue diseases. *J Cataract Refract Surg*. 2008;34(4):527. Epub 2008/03/26.
258. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. 1998;66(1):97-103. Epub 1998/06/17.
259. Cheema AS, Mozayan A, Channa P. Corneal collagen crosslinking in refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012;23(4):251-6. Epub 2012/05/10.
260. Vinciguerra P, Albe E, Trazza S, Rosetta P, Vinciguerra R, Seiler T, et al. Refractive, topographic, tomographic, and aberrometric analysis of keratoconic eyes undergoing corneal cross-linking. *Ophthalmology*. 2009;116(3):369-78. Epub 2009/01/27.





## X. Trabajos más relevantes del doctorando relacionados con la temática de la tesis Doctoral

---

### Diploma de Estudios Avanzados

Obtención del Diploma de Estudios Avanzados (DEA) titulado: “El fenómeno crosslinking: una alternativa a los tratamientos convencionales de la ectasia corneal. Estudio preliminar”. Fecha: 25 de noviembre de 2008. Calificación: Sobresaliente.

### Publicaciones

- **Elena Abellán**, Carmen Calles, Luis Cadarso, Francisco M. Sánchez Margallo. Tratamientos combinados. Estudio experimental en córnea porcina sobre el efecto combinado de Cross-linking e Intacs. En: Técnicas de modelado corneal desde la Ortoqueratología hasta el Cross-linking, Ed. Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva. Sevilla 2009, pp. 434-437.
- **Abellán E**, Calles-Vázquez MC, Cadarso L, Sánchez FM, Usón J. Diseño y validación de un simulador para el entrenamiento en la capsulotomía circular continua en la facoemulsificación. Arch Soc Esp Oftalmol. doi: 10.1016/j.oftal.2013.01.015

### Comunicaciones a congresos

- L. Cadarso, C. Calles, **E. Abellán**, J. Usón. Comunicación Oral: “Crosslinking corneal asociado a implante de Intacs en ojos de cerdo vivo” durante el 2nd International Congress of Collagen Cross-Linking”. Switzerland, Zurich, 8 y 9 Diciembre 2006.
- **Abellán E**, Calles C, Cadarso L, Sánchez FM. Comunicación Oral: “Estudio experimental en córnea porcina sobre el efecto combinado de cross-linking e Intacs. Avance preliminar” durante XVII Congreso Internacional de la Sociedad Española de Cirugía Veterinaria. Cáceres, España, 6-8 Noviembre 2009. Premio a la mejor comunicación en pequeños animales.
- **Abellán E**, Calles C, Espinosa A, Usón J, Sánchez FM, Cadarso L. Comunicación Oral: “Evaluación de los cambios morfológicos secundarios al tratamiento crosslinking en la córnea del conejo. Estudio experimental”. Congreso de Queratocono. Baiona (Pontevedra), España, 11-13 Noviembre 2010.
- **Abellán Rubio, Elena**; Calles Vázquez, Carmen; Sánchez Margallo, Francisco Miguel; Cadarso Suárez, Luis. Comunicación Oral: ” Evaluación a medio plazo de los cambios morfológicos, topográficos e histológicos tras el tratamiento crosslinking en córnea de conejo”. 87 Congreso Sociedad Española de Oftalmología. Oviedo. 21-24 Septiembre 2011.
- **Abellán Rubio E**, Calles Vázquez MC, Espinosa Sánchez A, Usón Gargallo J, Sánchez Margallo Fm, Cadarso L. Comunicación Oral: “Efectividad del tratamiento crosslinking a largo plazo en cornea de conejo”. XVII Congreso de la Sociedad de Investigaciones Quirúrgicas. Oviedo. 26-28 Octubre 2011.

- **Abellán Rubio E**, Calles Vázquez C, Usón Gargallo J, Sánchez Margallo, FM, Cadarso Suárez, L. Comunicación Oral: “Evaluación de los cambios histológicos secundarios al tratamiento crosslinking en la córnea del conejo”. II Congreso de Queratocono. Vigo, España, 21-23 Junio 2012.
- **Abellán Rubio E**, Calles Vázquez C, Ballestín Rodríguez A, Usón Gargallo J, Sánchez-Margallo FM, Cadarso Suárez L. Comunicación Oral/Póster: “Conductive keratoplasty with or without associated crosslinking experimental study in the rabbit model”. 9th International Congress of Corneal Cross-Linking. Dublín, Irlanda, 6-7 Diciembre 2013.

## **Proyectos relacionados con la temática de la Tesis**

### **1. Proyectos concedidos**

- Título del proyecto: “El fenómeno de crosslinking: una alternativa clínica casi incruenta a los tratamientos convencionales de ectasias corneales (queratoplastias, anillos intracorneales, trasplante de córnea)”.

Financiación: Plan Regional de Investigación      Fecha de inicio-fin: 2006-2007

Participación: Becario

### **2. Proyectos en fase experimental**

- Título del proyecto: “Tratamiento crosslinking asociado a queratoplastia conductiva: técnica novedosa alternativa al trasplante de córnea”.

Financiación: Fundación Mutua Madrileña      Fecha de inicio-fin: 2012-2013

Participación: Investigadora Principal



