



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



## TRABAJO FIN DE MÁSTER

### ***CROSSLINKING DEL COLÁGENO CORNEAL: ESTUDIO COMPARATIVO DEL TIPO DE RIBOFLAVINA Y DOSIS UVA TOTAL MEDIANTE LA VALORACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE LA CÓRNEA EN EL CONEJO***

Autor:

ALFONSO CRUZ ANDRÉS

Director/es:

JOSÉ BENITO RODRÍGUEZ GÓMEZ

Facultad de Veterinaria

2013-2014

---

Autor: ALFONSO CRUZ ANDRÉS

Título: ***CROSSLINKING DEL COLÁGENO CORNEAL: ESTUDIO COMPARATIVO DEL TIPO DE RIBOFLAVINA Y DOSIS UVA TOTAL MEDIANTE LA VALORACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DE LA CÓRNEA EN EL CONEJO.***

---

Memoria Proyecto Fin de Máster (Curso 2013/2014)

Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

(C/ Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, España)

“Los conocimientos científicos tienen una vida corta y necesitan sustituirse o renovarse adecuadamente con intervalos regulares.”

**Viejo Bañuelos, 2001.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Ángel L. Ortillés Gonzalo, por todo su empeño, dedicación y constancia con todas sus metas, tanto en la Medicina Veterinaria en general como en la Oftalmología en particular, sin el que todo esto no hubiera sido posible y al que le deseo lo mejor en su futura vida profesional. A todos los médicos e ingenieros del grupo AMB (Mecánica Aplicada y Bioingeniería) del Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (i3A), que han participado en este proyecto multidisciplinar. Y por último, a todos los animales que han participado en este estudio, ya que todos los que nos beneficiamos de los avances de la ciencia estamos en deuda con ellos.

---

## T A B L A D E C O N T E N I D O

---

✓ <b>RESUMEN</b> .....	6
✓ <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	8
- OBJETIVOS DE ESTUDIO .....	8
- LUGAR DE REALIZACIÓN .....	8
- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	9
✓ <b>METODOLOGÍA</b> .....	19
- SELECCIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	19
- <i>CROSSLINKING DEL COLÁGENO CORNEAL (CXL)</i> .....	20
- ENSAYOS BIOMECÁNICOS .....	22
- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
✓ <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	25
- TEST DE TRACCIÓN UNIAXIAL <i>IN VITRO</i> Y DE INDENTACIÓN <i>IN VIVO</i> .....	25
- ESPESOR CORNEAL CENTRAL (ECC) Y PRESIÓN INTRAOCULAR (PIO) .....	27
- COMPARACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
✓ <b>CONCLUSIONES</b> .....	31
- FUTUROS OBJETIVOS Y LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN .....	32
✓ <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33

### APÉNDICE

---

## RESUMEN

---

El *crosslinking* o reticulación del colágeno corneal es una técnica utilizada para mejorar y reforzar la biomecánica corneal, basada en la combinación de riboflavina y luz ultravioleta A. Su efecto induce la formación de uniones covalentes entre las fibras de colágeno del estroma corneal, aumentando su estabilidad mecánica. El objetivo del presente estudio es evaluar mediante ensayos de indentación *in vivo* y de tracción uniaxial *in vitro* el efecto de esta técnica sobre las propiedades biomecánicas de la córnea, así como estudiar las propiedades elásticas y viscoelásticas de ésta a medio plazo en animales de experimentación. Para ello, se utilizaron 12 conejos machos neozelandeses, de peso comprendido entre 2 y 2,5 kg, testados previamente para descartar enfermedades oculares o sistémicas. Bajo anestesia intramuscular y ocular tópica, todos ellos fueron tratados de forma bilateral mediante *crosslinking* del colágeno corneal estándar ( $3 \text{ mW/cm}^2$ ; 30 minutos). Previamente al tratamiento mediante *crosslinking* y tras éste a los días 7, 21 y 56, y bajo similar protocolo anestésico, se realizaron ensayos de indentación *in vivo* registrando previamente los valores del espesor corneal central (ECC) y la presión intraocular (PIO). Tras los ensayos de indentación *in vivo*, previo al tratamiento mediante *crosslinking* y a los días 7 y 56, 4 animales fueron eutanasiados para la realización de los ensayos de tracción uniaxial *in vitro*, registrando previamente los valores del ECC. Posteriormente se procedió al análisis estadístico de los datos obtenidos. Mediante el ensayo de indentación *in vivo*, se observó un comportamiento mecánico más elástico a los días 7 y 21 tras el tratamiento respecto al observado previamente a éste, recuperando la rigidez inicial al día 56. Por el contrario, mediante el ensayo de tracción uniaxial *in vitro*, se observó un comportamiento mecánico más rígido a los días 7 y 56 tras el tratamiento respecto al observado previamente a éste, sin observar diferencias estadísticamente significativas entre los días 7 y 56. En ambos ensayos únicamente se observó diferencia estadísticamente significativa en el ECC a los 56 días tras el tratamiento respecto al observado previamente y a los 7 y 21 días después de su aplicación. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presión intraocular. Desde el punto de vista mecánico, la combinación del ensayo de indentación *in vivo* y de tracción uniaxial *in vitro* para la valoración de la estabilidad mecánica aportada por los queratocitos y las fibras de colágeno corneales, respectivamente, constituyen un método adecuado para la caracterización completa de las propiedades biomecánicas corneales tras el tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal.

## ABSTRACT

Corneal collagen crosslinking is a technique that improves and reinforces the corneal mechanic, based on the combined action of the riboflavin and ultraviolet-A light giving rise to new covalent links among collagen fibers of the corneal stroma increasing its mechanic stability. The aim of the present study is to perform an *in vivo* indentation and *in vitro* uniaxial tensile tests to investigate the effect of corneal collagen crosslinking on the corneal biomechanical behavior and study the elastic and viscoelastic behavior along the time in experimental animals. In order to carry out this aim, 12 male New Zealand white rabbits were used, weight ranged from 2 to 2.5 kg. All animals were healthy and free of clinically observable ocular and systemic diseases. Bilateral standard corneal collagen crosslinking (3 mW/cm<sup>2</sup>; 30 minutes) was performed under intramuscular and ocular anesthesia. *In vivo* indentation tests were performed using a similar anesthetic protocol before and after corneal collagen crosslinking at 7th, 21st and 56th day. Intraocular pressure (IOP) and central corneal thickness (CCT) were measured before each *in vivo* indentation test. For the *in vitro* uniaxial tensile tests and after performing the *in vivo* indentation tests, 4 rabbits were euthanatized before crosslinking, 4 rabbits at 7th day and 4 rabbits at 56th day. ECC was measured before each uniaxial tensile test. Afterwards, statistical analysis was performed. Regarding the indentation test, at 7th and 21st day after crosslinking, the corneal tissue showed the most elastic behavior and afterwards was observed a progressive recovery of corneal stiffness until the 56th day. Regarding the uniaxial tensile test, unlike in the *in vivo* indentation tests, at 7th day after crosslinking, the corneal tissue showed the stiffest behavior remaining practically constant until the 56th day, not finding statistically significant differences between at 7th and 56th day. In both types of tests, there were statistically significant differences in the CCT at 56th day with respect to CCT before and after crosslinking at 7th and 21st day, but not between them. No statistically significant differences in the IOP were found. As regards the mechanical response, *in vivo* indentation test and *in vitro* uniaxial tensile test combination to assess the mechanical stability provided from corneal keratocytes and corneal collagen fibers, respectively, constitute a suitable method to typify the corneal biomechanical properties after corneal collagen crosslinking.

---

## INTRODUCCIÓN

---

### OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1. Establecimiento *in vivo* de las propiedades biomecánicas de la córnea sana en el conejo como base de comparación y modelo animal en el estudio de patologías corneales.
2. Estudio del ensayo mecánico de indentación corneal *in vivo* como método alternativo y complementario para el establecimiento de las propiedades biomecánicas corneales.
3. Comparación de los resultados obtenidos con el ensayo mecánico de indentación corneal *in vivo* y el de tracción unaxial *in vitro* tras el tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal en el conejo.
4. Comparación del comportamiento biomecánico y efecto del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal a medio plazo.
5. Extrapolación de los resultados obtenidos y valoración del conejo como modelo animal experimental en el tratamiento de ectasias corneales (queratocono) mediante *crosslinking* del colágeno corneal en córneas de espesor reducido.

### LUGAR DE REALIZACIÓN

⇒ FACULTAD DE VETERINARIA (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA):

Laboratorio de la Unidad de Patología Quirúrgica y Cirugía del Departamento de Patología Animal.

⇒ INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA DE ARAGÓN I3A (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA) Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED (BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y BIOMEDICINA):

Plataforma de Caracterización Tisular y Laboratorio de Biomecánica.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### FUNDAMENTOS Y EFECTOS TERAPÉUTICOS DEL TRATAMIENTO MEDIANTE *CROSSLINKING* DEL COLÁGENO CORNEAL

La reticulación o *crosslinking* se basa en la creación de enlaces covalentes o iónicos que unen una macromolécula (polímero) a otra, entendiendo por macromolécula un polímero sintético o natural como pueden ser las proteínas. La reticulación es un proceso bien conocido en los tejidos humanos, asociado al envejecimiento<sup>1</sup>, a la diabetes *mellitus*<sup>2</sup>, y consecuencia de las reacciones de Maillard. El curtido de pieles de animales fue su primera aplicación. En el ámbito de la medicina se utilizó por primera vez en odontología para el curado de compuestos con luz ultravioleta (fotopolimerización)<sup>3</sup>. En cirugía cardiaca, se empleó junto con glutaraldehído para reducir la calcificación temprana y el deterioro tisular de las válvulas cardíacas. En general y durante el proceso de envejecimiento natural del cuerpo humano, se producen fenómenos de *crosslinking* enzimáticos y no enzimáticos de manera fisiológica en varias partes del organismo. Con la edad, aumenta el número de uniones o *crosslinks* así como la rigidez de las estructuras<sup>4,5</sup>. Este fenómeno se ha observado en la córnea, el cristalino, la piel, los vasos sanguíneos y los cartílagos articulares. Además, se sabe que la luz solar y el tabaquismo causan cambios análogos. Desde que la reticulación (*crosslinking*) se utilizó por primera vez en tejidos oculares, no han cesado los debates sobre las indicaciones, contraindicaciones y variantes a la técnica de reticulación del colágeno corneal convencional<sup>6</sup>.

La estabilidad biomecánica de la córnea se determina principalmente por la estructura de sus moléculas de colágeno y su distribución espacial, es decir, las fibras de colágeno. El objetivo fundamental del *crosslinking* del colágeno corneal es el incremento artificial del número de *crosslinks* en el estroma corneal para mejorar así la estabilidad mecánica de éste. Este tratamiento se basa en el proceso de fotopolimerización de las fibras de colágeno del estroma corneal inducido por la acción combinada de riboflavina (vitamina B2) como fotosensibilizador y de luz ultravioleta A (UVA) generada artificialmente a 370 nm, longitud de onda pico de absorción de la riboflavina<sup>7</sup>.

La presencia de riboflavina en la córnea durante el procedimiento atenúa considerablemente la incidencia de energía radiante en el interior del ojo, energía que es

colimada generalmente en una zona de diámetro de entre 8 y 9 mm, de manera que los tejidos externos a esta zona no sufran los efectos de la radiación. Para lograr el resultado óptimo tras la aplicación de *crosslinking* del colágeno corneal es necesaria una concentración suficiente de riboflavina. Esta concentración se puede conseguir mediante varios métodos: difusión a través del estroma previamente desepitelizado (método estándar), difusión a través del epitelio intacto hasta el estroma (método transepitelial) o inoculación directa intraestromal (técnica del anillo o de la aguja).

Sin embargo, el método estándar ha sido el más utilizado ya que el epitelio intacto constituye una barrera de difusión para la riboflavina, evitando una correcta saturación del estroma corneal, por lo que debe ser eliminado previamente a la instilación de riboflavina<sup>8,9</sup>. Asimismo, es necesario un determinado tiempo para conseguir la difusión completa de riboflavina hasta las capas más profundas de la córnea que garantice la correcta generación de las uniones covalentes y la protección de las estructuras intraoculares. En la córnea previamente desepitelizada (método estándar) se observó que la instilación de riboflavina cada 3 minutos durante un tiempo de 20-30 minutos antes de la irradiación era suficiente para conseguir la concentración necesaria que permitiese la absorción de la mayor parte de la radiación UVA, garantizando la protección del endotelio corneal, cristalino y retina<sup>10</sup>.

La base bioquímica del tratamiento sobre el tejido corneal se fundamenta en la generación de radicales de oxígeno a partir de la riboflavina por medio de una reacción de fotoxidación. La luz UVA provoca la excitación de la riboflavina y su paso a estado de triplete, generando especies reactivas de oxígeno (ERO), fundamentalmente en estado de singlete (forma excitada de la molécula de oxígeno) y en menor medida radicales superóxido. Las ERO reaccionan con diversas moléculas favoreciendo la transformación de los grupos amino terminales de las cadenas laterales de las fibras de colágeno corneal en grupos aldehído. Seguidamente, los grupos amino y aldehído forman enlaces covalentes entre las cadenas laterales incrementando el número total de enlaces covalentes en el estroma corneal. Este hecho tiene lugar a través de dos mecanismos, el primero de los cuales (tipo I) está favorecido por bajas concentraciones de oxígeno en las que se producen radicales o iones de radicales; y el segundo (tipo II) en el que la riboflavina excitada reacciona para dar oxígeno en estado de singlete. Bajo condiciones aeróbicas, lo que ocurre en los primeros 15 segundos de exposición UVA, se produce la fotoxidación de las proteínas estromales principalmente por la reacción de tipo II. Tras esta breve fase, el oxígeno disminuye y la reacción entre

riboflavina y proteínas es predominantemente de tipo I. Las especies reactivas pueden entonces inducir la unión covalente de varios tipos de moléculas del estroma corneal: colágeno, proteoglicanos (moléculas de la matriz extracelular con un núcleo proteico con el que se unen a glucosaminoglicanos), DNA y RNA (Figura 1)<sup>6</sup>.

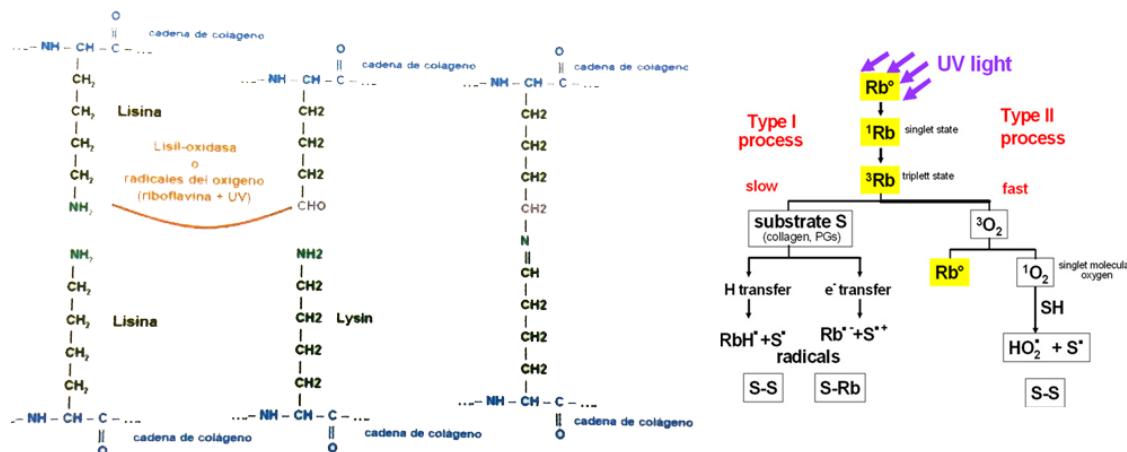


Figura 1. Esquema de la reacción bioquímica que da lugar a la generación de radicales libres de oxígeno y la formación de enlaces covalentes entre los grupos amino y aldehído de las cadenas laterales de las fibras de colágeno estromal.

Fuente: Iseli HP, Hafezi F, Mrochen M, Seiler T. Estado actual de la reticulación del colágeno corneal. En: Cezón J, editores. Técnicas de modelado corneal, desde la Ortoqueratología hasta el Cross-Linking. Sevilla: SECOIR; 2009. p. 387. / Raiskup F, Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. The Ocular Surface 2013; 11(2): 65-74.

El uso estandarizado de una concentración de riboflavina al 0,1% fue establecido para el tratamiento de córneas con estromas de un espesor reducido de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  por dos razones<sup>11</sup>: el efecto biomecánico en un amplio abanico de concentraciones (0,015 a 0,5%) es independiente de la concentración y el uso de dicha concentración evita el daño ocular debido a la radiación UVA<sup>8,12</sup>. Una concentración del 0,1% produce un coeficiente amplio de absorción con el que el 90% de la radiación UVA se absorbe en el estroma, mientras que el endotelio, cristalino y retina se encuentran protegidos de la luz UVA<sup>13,14</sup>. La riboflavina es efectiva no sólo como generadora de oxígeno en estado de singlete sino que también es un *scavenger* a altas concentraciones para los radicales libres, así mantiene un balance entre la formación y destrucción de oxígeno en estado de singlete<sup>15</sup>. Además, un incremento de la concentración de riboflavina no aumenta necesariamente la creación de oxígeno en estado de singlete siempre que se haya llegado a un estado de saturación apropiado. Dado que en un espesor estromal de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ , el 90% de la radiación UVA es absorbida, reduciendo así el daño endotelial y previniendo los efectos secundarios de la radiación sobre

la retina, córneas con espesores menores de 400  $\mu\text{m}$  son excluidas del tratamiento<sup>10</sup>. Sin embargo, se han desarrollado diversos métodos para tratar pacientes con espesores corneales de menos de 400  $\mu\text{m}$ :

1. Aplicar soluciones hiposmolares de riboflavina al 0,1% para generar edema corneal<sup>16,17</sup>. Usando esta técnica se pueden tratar córneas de hasta un espesor inicial de 320  $\mu\text{m}$ <sup>16,18</sup>.
2. Disminuir la dosis total de irradiación UVA en relación al espesor estromal<sup>19</sup>.
3. Utilizar la técnica de desbridamiento epitelial, sin eliminar el epitelio en la zona de menor espesor en córneas de menos de 400  $\mu\text{m}$ <sup>19,20</sup>.
4. Incrementar la concentración de la solución de riboflavina al 0,2% para conseguir mayor absorción de luz UVA en el estroma anterior, disminuyendo así la exposición del endotelio<sup>19</sup>.
5. Combinar varias de las técnicas anteriores.

Así pues, en la medida de lo posible es necesario evitar la exposición del ojo a la luz UVA. Las regulaciones de salud y seguridad limitan la dosis diaria de intensidad UVA a una irradiación de 1  $\text{mW/cm}^2$  sin fotosensibilizadores que protejan la córnea<sup>21</sup>. En los experimentos animales realizados previamente a la validación del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal, el umbral de daño epitelial tras una irradiación UVA de 30 minutos sin fotosensibilizador fue de 4  $\text{mW/cm}^2$ , de manera que durante el tratamiento se utiliza una radiación de 3  $\text{mW/cm}^2$  seguido de la aplicación de riboflavina. Así, en una capa de estroma de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  de espesor, el 90% de la radiación UVA se absorbe en la córnea que ha sido tratada con riboflavina, y el endotelio se expone sólo a 0,18  $\text{mW/cm}^2$ , evitando el daño de cristalino y retina<sup>22</sup>. Asimismo, este valor está por debajo del umbral de daño de 0,35  $\text{mW/cm}^2$  establecido para experimentación animal<sup>23</sup>.

Desde el desarrollo de la técnica, descrita por Wollensak y cols. para el tratamiento del queratocono en 1998<sup>24</sup>, han surgido 2 plataformas comerciales para la realización de este tratamiento, el *crosslinking* estándar (CXL; 3  $\text{mW/cm}^2$  durante 30 minutos) y el acelerado (KXL; 30  $\text{mW/cm}^2$  durante 3 minutos) (Figura 2). Ambas permiten alcanzar una dosis total de radiación UVA similar (5,4  $\text{J/cm}^2$ ) y comparten el mismo principio básico, consistente en aumentar el entrecruzamiento de las fibras de colágeno corneal aplicando radiación UVA con una longitud de onda de 370 nm sobre la córnea previamente saturada de una solución de

riboflavina (vitamina B2) al 0,1% que actúa como fotosensibilizador<sup>25</sup>. Así, como se ha comentado anteriormente, dicho efecto permite incrementar la estabilidad mecánica de la córnea en una zona limitada, localizada en el área de aplicación del haz UVA, durante un periodo corto de tratamiento suficiente para lograr el objetivo terapéutico buscado y manteniendo la transparencia corneal inalterada, no comprometiendo así la visión.



Figura 2. Equipos para el tratamiento mediante *crosslinking* de colágeno corneal estándar (izquierda; UVA CBM-X-Linker, CSO, Scandicci Firenze, Italia) y acelerado (derecha; KXL AVEDRO, Avedro Inc., Waltham, MA, EE.UU.).

Fuente: [www.carletonltd.com](http://www.carletonltd.com) / [www.avedro.com](http://www.avedro.com)

Los efectos del *crosslinking* del colágeno corneal mejor descritos hasta el momento incluyen el aumento de la rigidez del tejido corneal y de la resistencia a la digestión enzimática del colágeno, la disminución del edema estromal y de la permeabilidad corneal, y el aumento de la estabilidad mecánica, pudiendo ser todos ellos útiles en diversas queratopatías (Figura 3)<sup>26,27,28,29,30</sup>. Por ejemplo, mientras que en las queratectasias interesa un incremento de la rigidez, en los cuadros de queratomalacia es necesaria mayor resistencia a la proteólisis enzimática. En cuanto a la distrofia endotelial de Fuchs, la menor tendencia al edema corneal puede reducir el dolor y mejorar la agudeza visual. Sin embargo, aunque los efectos de este tratamiento han sido ampliamente estudiados, es una técnica en constante evolución, habiéndose descrito también propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias en la combinación de riboflavina con luz ultravioleta A (UVA)<sup>31,32</sup>.

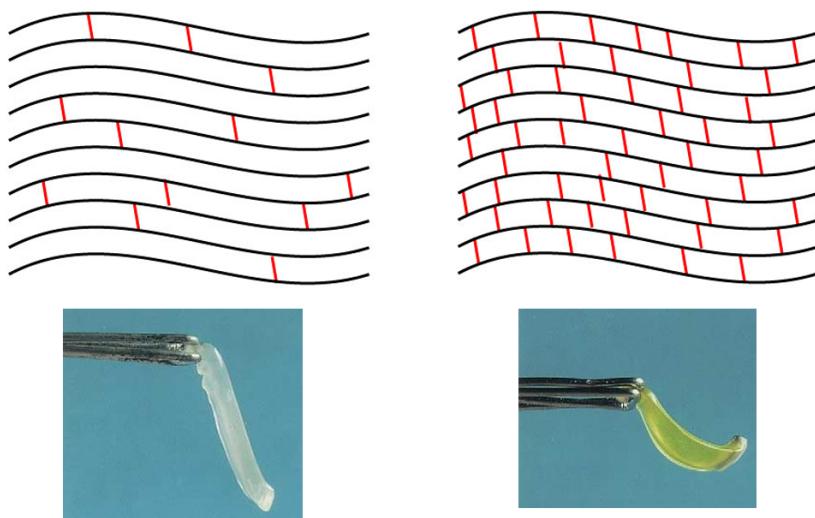


Figura 3. Esquema del efecto fundamental del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal. Número de enlaces covalentes entre las fibras de colágeno y rigidez corneal antes (izquierda) y después (derecha) de su aplicación.

Fuente: Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin ultraviolet A induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. American Journal of Ophthalmology 2003; 135(5): 620-627. / [www.visioncamberwell.com.au](http://www.visioncamberwell.com.au)

#### APLICACIONES MÁS FRECUENTES DEL CROSSLINKING DEL COLÁGENO CORNEAL

Inicialmente, el *crosslinking* del colágeno corneal se introdujo como técnica alternativa en el tratamiento del queratocono progresivo, sin embargo esta técnica se ha utilizado con éxito en el tratamiento de otras patologías corneales como la degeneración marginal pelúcida, la queratectasia iatrogénica posquirúrgica (post-LASIK), la queratitis infecciosa, la queratopatía bullosa, la queratomalacia, y como reintervención o combinación con otras terapias (anillos corneales intraestromales)<sup>27,31,33,34,35,36,37</sup>.

La degeneración marginal pelúcida (DMP) es una ectasia corneal no inflamatoria, bilateral en la mayoría de casos, asimétrica y de etiología desconocida, caracterizada por un adelgazamiento periférico inferior del estroma corneal y que suele aparecer entre los 20 y 40 años de edad. Resulta fácil confundirla con el queratocono pero a diferencia de éste, los pacientes con DMP pueden padecer este tipo de ectasia y mantener durante años una agudeza visual aceptable, lo que dificulta su diagnóstico. Este hecho es debido a que la ectasia se presenta en la parte inferior de la córnea (marginal) no afectando inicialmente al eje visual y por lo tanto no dificultando la visión. Sin embargo, con el paso de los años esta ectasia se

desarrolla y termina por afectar definitivamente la visión del paciente. Por otro lado, la queratectasia iatrogénica posquirúrgica (post-LASIK) es consecuencia del tratamiento con láser debido a la reducción de la resistencia mecánica corneal<sup>38</sup>. Se caracteriza por una deformación de la curvatura corneal, aumentando progresivamente la pendiente de la parte central o inferior de la córnea asociándose a intensos cambios refractivos y reducción de la capa estromal. En ambos casos, el efecto estabilizador y el incremento de la rigidez producido por el *crosslinking* resulta muy beneficioso en su resolución.

La queratitis infecciosa y la queratomalacia son patologías corneales debidas a agentes infecciosos frente a los cuales se ha demostrado la efectividad antimicrobiana del *crosslinking*<sup>31,38,39</sup>. La queratopatía bullosa es una degeneración corneal causada generalmente por una descompensación endotelial en la que se produce edema corneal, tras el cual pueden aparecer bullas o vesículas subepiteliales producidas por un paso de fluido desde las capas internas a las externas debido a un endotelio dañado y, por lo tanto, no funcional. Debido al efecto reductor de la permeabilidad corneal, el *crosslinking* se utiliza con resultado exitoso en la mejora de la visión en estos casos<sup>40</sup>.

La patología más comúnmente tratada mediante *crosslinking* es el queratocono, ectasia corneal asimétrica, bilateral, progresiva y no inflamatoria de la córnea, relativamente rara, debida a una inestabilidad biomecánica gradual, consistente en una deformación cónica corneal con adelgazamiento de la capa estromal y que afecta a 1 persona de cada 2000 de mediana edad<sup>41</sup>. Normalmente cursa con marcada miopía y astigmatismo, lo que lleva a la disfunción visual. Existen varias opciones de tratamiento, incluyendo métodos más conservadores como lentes de contacto blandas y rígidas, diversas intervenciones quirúrgicas como la colocación de anillos intraestromales corneales y en casos más graves trasplante corneal para la rehabilitación visual<sup>42</sup>. Los tratamientos quirúrgicos disponibles cambian la forma de la córnea o la reemplazan por una córnea sana, ya sea completa o parcialmente, pero ninguno modifica los parámetros biomecánicos alterados. El *crosslinking* se considera una técnica menos invasiva y más económica que el trasplante corneal y al contrario que otros tratamientos, modifica las propiedades biomecánicas de las fibras de colágeno corneal<sup>33</sup> (Figura 4).

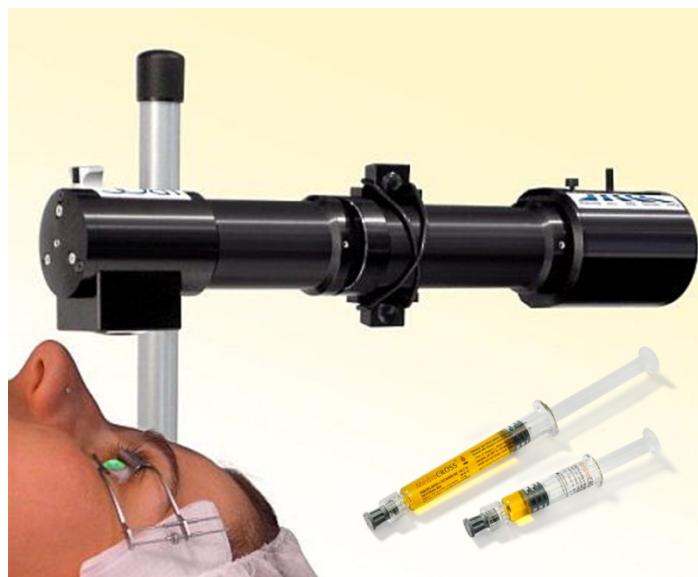


Figura 4. Posicionamiento del paciente en casos de tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal.

Fuente: [www.curielvision.com](http://www.curielvision.com) / [www.peschkemed.com](http://www.peschkemed.com)

#### TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE LAS PROPIEDADES CORNEALES

Se han descrito diversos métodos para la valoración de las propiedades biomecánicas corneales tras el tratamiento mediante *crosslinking*. Entre los efectos de dicho tratamiento más comúnmente valorados desde el punto de vista mecánico encontramos la rigidez corneal, la histéresis y el factor de resistencia corneal, el diámetro de las fibras de colágeno, el comportamiento termomecánico, y la resistencia a la digestión enzimática y a la hidratación corneal.

En primer lugar, respecto a la valoración de la rigidez corneal, varias técnicas han sido utilizadas con diferentes resultados. Spoerl y cols. (1998)<sup>43</sup> utilizaron por primera vez la extensiometría de probetas y fueron los primeros en reportar un aumento del espesor corneal tras el tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal. La técnica consiste en disecar probetas corneales con una cierta longitud y anchura de la parte central de la córnea y clampar individualmente cada una de éstas entre dos mordazas, colocándolas verticalmente. La tensión ( $\epsilon$ ) se aumenta linealmente a cierta velocidad y se mide el esfuerzo relativo ( $\sigma$ ). Los valores se establecen mediante una función exponencial  $\sigma=A \exp (B \times \epsilon)$  para calcular el módulo de Young (proporción entre la tensión y la deformación que refleja la elasticidad de un tejido). Es una técnica simple y muy extendida en la comunidad científica para obtener los valores de tensión y deformación de numerosos tejidos. Sin embargo, la disección aplana las

probetas corneales, que fisiológicamente presentarían una naturaleza curvada, influyendo no sólo en la longitud de la probeta, sino que además varía el espesor debido a su sección, destruyendo tejido corneal. Asimismo, este tipo de técnica únicamente puede realizarse *in vitro*. Debido a las limitaciones de la extensiometría de probetas, Ahearne y cols. (2008)<sup>44</sup> plantearon el desarrollo de un nuevo método de evaluación a través de microindentación esférica. El aparato consta de dos partes principales: un recipiente para muestras y una esfera de indentación con un sistema de análisis de imagen. Esta técnica se puede utilizar en investigación laboratorial para examinar el efecto de distintas concentraciones de riboflavina o utilizar otros agentes para el *crosslinking* (p. ej. glutaraldehído). Sin embargo, esta técnica no se puede utilizar en tejidos corneales vivos. Un tipo diferente de ensayo experimental a través de inflado fue utilizado por Kling y cols. (2010)<sup>45</sup> para realizar medidas completas de tensión-deformación en todo el globo ocular, en vez de utilizar probetas corneales. El test se basa en la idea de que el espesor corneal y la curvatura cambian en respuesta a modificaciones en la presión intraocular. Durante el ensayo, la presión se incrementa progresivamente mediante la inyección intraocular de suero salino fisiológico y de este modo la córnea es estirada y aplanada, disminuyendo además su espesor. Los resultados deberían ser muy similares a los ensayos *in vivo* ya que se utiliza todo el globo ocular *in vitro* en vez de probetas, solventando los problemas de la extensiometría. Sin embargo, esta técnica requiere una monitorización continua de la hidratación corneal durante las mediciones para mimetizar las mediciones *in vivo*. Además, mediante esta técnica no se tienen en consideración los cambios en la curvatura corneal. Así, los resultados de esta técnica no se han reproducido en córneas humanas. El inflado y la extensiometría de probetas miden únicamente el módulo de elasticidad de la córnea, sin embargo, el efecto del *crosslinking* no es similar en toda su extensión y profundidad, siendo más marcado en el estroma anterior<sup>45,46,47,48</sup>. De forma ideal, para evaluar el efecto del *crosslinking*, el módulo de elasticidad debería medirse en distintas regiones de la córnea. Varios autores han utilizado con éxito la nanoindentación y microscopía de barrido acústico en tejidos humanos para medir las propiedades biomecánicas corneales<sup>49,50,51</sup>. Mientras que la microscopía permite una evaluación cuantitativa y cualitativa de la biomecánica mediante el uso de ultrasonidos sin dañar la muestra, la nanoindentación es una herramienta muy útil para medir y mapear las propiedades elásticas de materiales y tejidos. De esta manera, las limitaciones de la extensiometría quedan resueltas, ya que se pueden tomar múltiples medidas en cada córnea, lo que incrementa la precisión. En este ensayo se aplica una carga controlada en la superficie corneal para inducir una deformación local y calcular la rigidez del material<sup>50,52</sup>.

Otros factores importantes, que a diferencia del resto pueden ser estudiados *in vivo*, son la histéresis y el factor de resistencia corneal. Mientras la histéresis corneal (HC) es un indicador de la viscosidad de la córnea, el factor de resistencia corneal (FRC) representa la resistencia de la córnea a la deformación<sup>53,54</sup>. Ambos factores se determinan mediante un tonómetro de aplanación de no-contacto ("Ocular Response Analyzer") que evalúa la respuesta corneal a la indentación como resultado de pulsos de aire. Cuando el aire pulsado es liberado y choca contra la córnea, ésta se deforma dando un punto de aplanación (P1). La presión entonces disminuye gradualmente hasta que la córnea recupera su forma original pasando por otro punto de aplanación (P2). Este sistema fue utilizado con éxito por Sedagath y cols. (2010)<sup>55</sup> para el estudio de los cambios en la HC y en el FRC tras la realización de *crosslinking* del colágeno corneal.

Respecto al incremento del diámetro de las fibras de colágeno debido al efecto del *crosslinking*, es importante tener en cuenta que dichas fibras forman parte del tejido corneal, especialmente de la capa estromal, y son responsables de la resistencia y rigidez corneal<sup>56,57</sup>. Además, la organización y orientación de las fibras de colágeno proporciona la transparencia corneal, importante para su correcta función<sup>56</sup>. Wollensak y cols. (2004)<sup>58</sup> utilizaron por primera vez la microscopía electrónica asociada a un software morfométrico para evaluar el diámetro de las fibras de colágeno de córneas sanas de conejos después del tratamiento mediante *crosslinking*.

En cuanto al comportamiento termomecánico, tras el tratamiento mediante *crosslinking* es esperable cierto daño térmico en la córnea debido a la larga duración del tratamiento (30 minutos) y a que la luz UVA es absorbida en gran medida en el tejido corneal. Así pues, esta técnica fue utilizada por Mencucci y cols. (2005)<sup>59</sup> para medir la temperatura superficial de la córnea. Mediante el uso de una termocámara de infrarrojos se comprobó que durante el tratamiento mediante *crosslinking* no se alcanzaba una temperatura suficiente como para producir daño corneal.

El aumento de la actividad colagenasa también juega un rol importante en la patogénesis de diferentes patologías corneales<sup>60</sup>. Esto ha llevado a diversos investigadores a estudiar la influencia del *crosslinking* en la resistencia corneal a la colagenolisis y otros factores enzimáticos. Así, Spoerl y cols. (2004)<sup>27</sup> valoraron dicho efecto en córneas de cerdo mostrando un aumento de la resistencia corneal principalmente a colagenasas y en menor proporción a la tripsina.

La alteración de la permeabilidad y el edema de la capa estromal de la córnea son también factores importantes que pueden afectar a la transparencia corneal y por tanto a la función visual<sup>61</sup>. Wollensak y cols. (2007)<sup>28</sup> estudiaron el estado de hidratación corneal tras el tratamiento mediante *crosslinking* en córneas de suidos. El estudio mostró que este comportamiento es dependiente del grado de *crosslinking*, de tal forma que cuanto mayor es éste menor es el estado de hidratación corneal.

Como se ha comentado hasta el momento, la caracterización de la biomecánica corneal tras la aplicación del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal se lleva a cabo normalmente por modelos experimentales *in vitro*. Sin embargo, el desarrollo de nuevos modelos *in vivo* podría permitir valorar los efectos del *crosslinking* del colágeno corneal y detectar cambios en las propiedades biomecánicas corneales a largo plazo tras el tratamiento. Actualmente, el Analizador de Respuesta Ocular (“Ocular Response Analyzer”, ORA) es el único aparato que proporciona medidas de la rigidez corneal *in vivo*, como la histéresis y la resistencia corneal<sup>54</sup>. Así, el desarrollo de otro tipo de técnicas de valoración *in vivo* que permitan una caracterización más completa de las propiedades biomecánicas de la córnea supondría un gran avance tanto a nivel científico como económico.

---

## MÉTODOLOGÍA

---

### SELECCIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para llevar a cabo el presente estudio se seleccionaron 12 conejos blancos neozelandeses, machos enteros de 2 meses de edad, obtenidos del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, con un peso comprendido entre los 2 y 2,5 kg. Durante todo el estudio, los animales se alojaron individualmente y fueron alimentados con una dieta estándar *ad libitum* (Pienso n. 511, Corporación Alimentaria Guissona S.A., Lleida, España). A cada animal se le asignó un número de registro y se anotó su edad y peso para poder así tener un control completo de los mismos de utilidad a la hora de establecer a posteriori relaciones estadísticas de los datos obtenidos. Para ello, se dispuso de plantillas prediseñadas para la toma de éstos.

En el momento del inicio del estudio todos los animales se encontraban bajo estricto control veterinario, con un historial clínico libre de enfermedades oculares y sin mostrar signos clínicos de ninguna enfermedad, tanto ocular como sistémica. Para ello a cada animal se le realizó un examen físico general y una exploración oftalmológica consistente en la valoración de la respuesta de amenaza, reflejos palpebrales y fotomotores directos y consensuados, test de producción lacrimal de Schirmer (Schirmer Tear Test Strips paper®; Madhu Instruments, New Delhi, India), biomicroscopía con lámpara de hendidura del segmento anterior (superficie ocular, cámara anterior, iris y cristalino) (Topcon SL-8Z®; Topcon Corp., Barcelona, España), oftalmoscopia directa e indirecta (Heine beta 200® y Heine omega 100®, Heine Optotechnik GmbH & Co., Herrsching, Alemania) del segmento posterior (cuerpo vítreo y fondo de ojo), test de fluoresceína para valorar la integridad corneal (Fluorescein paper®; Haag-Streit Internacional, Liebefeld-Bern, Suiza) y tonometría de aplanación para la medición de la presión intraocular (TonoPen XL®; Medtronic Inc., Jacksonville, EE.UU.).

El presente estudio se llevó a cabo de acuerdo con la declaración ARVO (“Association for Research in Vision and Ophthalmology”) para el uso de animales en investigación oftalmológica y de la visión. Todos los procedimientos se realizaron bajo licencia autorizada (Proyecto nº 15/13) aprobada por el Comité Ético Asesor para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado de los animales se realizó en concordancia con la Política Española de Protección Animal RD 53/2013 dependiente de la Directiva 2010/63 de la Unión Europea para la protección de los animales usados para experimentación y otros objetivos científicos.

### ***CROSSLINKING DEL COLÁGENO CORNEAL (CXL)***

En primer lugar, cada animal fue anestesiado intramuscularmente con una mezcla de medetomidina (0,14 mg/kg, Medeson®; Uranovet, Barcelona, España), ketamina (20 mg/kg, Imalgene 100 mg/ml®; Merial Laboratorios S.A., Barcelona, España) y butorfanol (0,3 mg/kg, Torbugesic®; Fort Dodge Veterinaria S.A., Girona, España). Antes del inicio de la realización del *crosslinking* del colágeno corneal y cada 10 minutos durante la realización de éste, se instiló como anestesia tópica 1 gota de hidrocloruro de tetracaína 0,1% y oxibuprocaína 0,4% (Colircusi Anestésico Doble®; Alcon Cusi, Barcelona, España).

Se procedió a la eliminación de la totalidad del epitelio corneal central (11 mm de diámetro) mediante un escarificador rotacional con una fresa de diamante de 3,5 mm de diámetro y grano medio (AlgerBrush II®; The Alger Company Inc., Lago Vista, EE.UU.). Dicha fresa fue esterilizada en un autoclave de vapor entre usos para cada conejo. La solución de riboflavina isoosmolar al 0,1% necesaria para la realización del CXL se elaboró diluyendo riboflavina-5-fosfato 0,5% y dextrano T500 20% (Sigma-Aldrich Química S.L., Madrid, España) en suero salino fisiológico (402,7 mOsmol/L). Dado que la solución era fotosensible, se protegió de la luz y se utilizó dentro de las primeras 2 horas de su elaboración. Se instilaron 2 gotas de riboflavina isoosmolar 0,1% cada 3 minutos durante 20 minutos antes de la irradiación valorando su penetración a través de la córnea mediante la visualización de riboflavina en la cámara anterior con lámpara de hendidura utilizando luz azul. Todas las córneas se irradiaron con UVA (3 mW/cm<sup>2</sup>; 370 nm) durante 20 minutos (dosis total de 3,6 J/cm<sup>2</sup>) utilizando el equipo CBM-X-Linker (CSO, Scandicci Firenze, Italia) (Figura 5). Durante el tratamiento la solución de riboflavina isoosmolar 0,1% se instiló cada 3 minutos para mantener la saturación de la córnea y cada 5 minutos se reforzó la anestesia tópica. Tras la realización del CXL, como antibioterapia de cobertura se administró ciprofloxacino (Oftacilox®, Alcon Cusi, Barcelona, España) en pomada una vez al día durante 5 días.

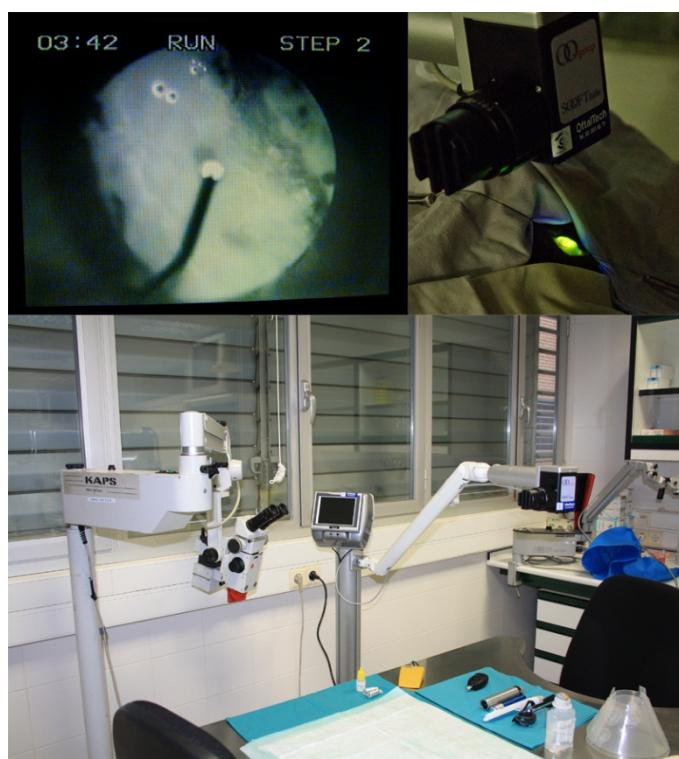


Figura 5. Tratamiento mediante CXL del colágeno corneal y material necesario para su realización.

## ENSAYOS BIOMECÁNICOS

La caracterización del comportamiento mecánico corneal se realizó mediante 2 tipos de test mecánicos (test de indentación *in vivo* y test de tracción uniaxial *in vitro*) con el mismo protocolo anestésico, tanto sistémico como tópico, que el utilizado para la realización del CXL.

Los test de indentación *in vivo* se llevaron a cabo antes (Control, PreCXL) y tras la realización de *crosslinking* del colágeno corneal a los días 7 (PostCXL-7d), 21 (PostCXL-21d) y 56 (PostCXL-56d). Para el test de tracción uniaxial *in vitro* y tras haber llevado a cabo los test de indentación *in vivo*, 4 conejos fueron eutanasiados con una sobredosis de 150 mg/kg de pentobarbital sódico intravenoso (Dolethal®; Vétoquinol E.V.S.A., Madrid, España) antes de la realización de CXL (PreCXL), 4 conejos tras la aplicación de CXL el día 7 (PostCXL-7d) y 4 conejos el día 56 (PostCXL-56d).

Durante la realización del test de indentación *in vivo* se colocó un blefarostato para el mantenimiento del ojo abierto durante todo el proceso, y se midió de forma estandarizada la presión intraocular (PIO) y el espesor corneal central (ECC). La medición de PIO se realizó mediante tonometría de aplanación (TonoPen XL®; Medtronic Inc., Jacksonville, EE.UU.). Los valores de PIO se establecieron como media de 3 medidas, considerándose válidas sólo aquéllas con un 95% de confianza. Las mediciones del ECC se determinaron como media de 10 valores registrados utilizando una sonda rígida de contacto mediante paquimetría ultrasónica (DGH 500 Pachette™; DGH Technologies Inc., Exton, EE.UU.). Todas las medidas se llevaron a cabo por un mismo investigador con experiencia en el uso de ambos aparatos de medida y en el mismo intervalo de tiempo (11:00 a.m. - 13:00 p.m.) para evitar las oscilaciones circadianas. Los test de indentación se repitieron 2 veces en cada ojo separando cada ensayo del siguiente 1 minuto y controlando el desplazamiento mediante un equipo Instron 5548 Microtester (Illinois Tool Works Inc., Glenview, EE.UU.) con una célula de carga máxima de 5 N. Se aplicaron 5 ciclos de carga (N) en el centro de la córnea utilizando un indentador de 3 milímetros de diámetro. La velocidad de desplazamiento aplicado fue de 0,5 mm/s hasta un desplazamiento máximo de  $\delta_{\text{máx}}=1$  mm (Figura 6).

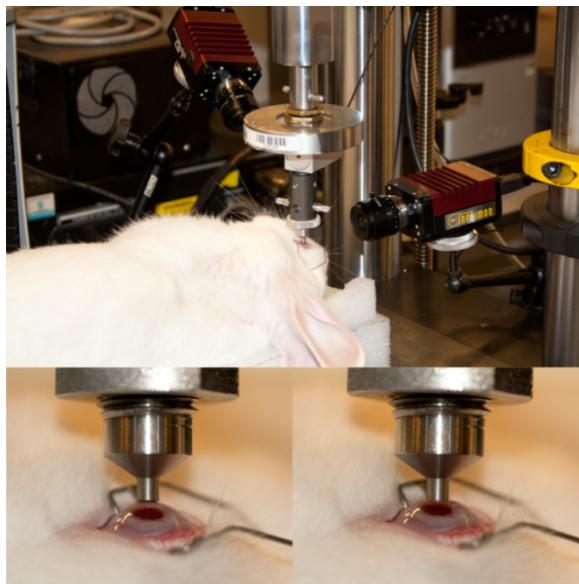


Figura 6. Test de indentación *in vivo*. Posicionamiento del animal e indentación corneal hasta una deformación máxima de 1 mm.

Para el test de tracción uniaxial *in vitro*, tras la enucleación del globo ocular se disecó un área circular incluyendo la totalidad de la córnea y un anillo escleral. Seguidamente se seccionó la muestra con un bisturí de doble filo obteniendo una probeta en posición vertical (incluyendo esclera y córnea) con un ratio de anchura/longitud de aproximadamente 1/7 para preservar la hipótesis de tensión uniaxial. La longitud de la probeta y su anchura se midieron con un micrómetro, mientras que el espesor corneal central se midió utilizando tanto el micrómetro como mediante paquimetría ultrasónica como media de 10 valores registrados (DGH 500 Pachette<sup>TM</sup>; DGH Technologies Inc., Exton, EE.UU.). Para mantener la hidratación del tejido corneal y prevenir el edema corneal causado por un ambiente húmedo, se aplicó una preparación de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) al 2% (Methocel<sup>®</sup> 2%; OmniVision AG, Puchheim, Alemania) alrededor de ambas superficies de la probeta corneal. El test se llevó a cabo inmediatamente después de la preparación. Las probetas se sujetaron verticalmente entre dos mordazas realizando el test de tracción bajo control del desplazamiento con un equipo Instron 5548 Microtester (Illinois Tool Works Inc., Glenview, EE.UU.) con una célula de carga máxima de 5 N. La velocidad de desplazamiento aplicado fue de 0,5 mm/s. Se registraron 3 ciclos de carga (N) para desplazamientos de  $\lambda=1,03$ ;  $\lambda=1,06$ ;  $\lambda=1,12$  y posteriormente se traccionó hasta completar la rotura de la muestra (Figura 7).



Figura 7. Test de tracción uniaxial *in vitro*. Sección de la probeta y aplicación de ciclos de tracción-relajación hasta alcanzar deformaciones del 3, 6, 12% de la longitud inicial y la posterior rotura de la misma.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las curvas ( $\pm$  desviación estándar) y los valores de cada ciclo de carga de cada test mecánico, así como el análisis estadístico, se obtuvieron y llevaron a cabo utilizando MatLab 2010a Software (The MatWorks Inc., Natick, EE.UU.) y SPSS para Macintosh versión 19.0 Software (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.).

Para los test de indentación *in vivo*, los valores de carga (N) se compararon a valores de deformación de  $\delta=0.5$  mm y  $\delta=1$  mm, mientras que para los test de tracción uniaxial, se compararon los módulos elásticos tangentes ( $\pm$  desviación estándar) obtenidos para cada uno de los grupos estudiados. El análisis estadístico se realizó utilizando un test t-Student para muestras pareadas (en el caso de distribuciones muestrales normales) o de Wilcoxon (en el caso de distribuciones muestrales no normales). Previamente se evaluó la normalidad de la distribución para las variables continuas en grupos con el test de Kolmogorov-Smirnov; los valores de  $p$  menores de 0,05 se consideraron significativos (distribución no normal). Asimismo, se obtuvo la media ( $\pm$  desviación estándar) de todos los valores de PIO y ECC en los test de indentación *in vivo* y de ECC en el test de tracción uniaxial *in vitro* y se compararon estadísticamente siguiendo la misma metodología.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### TEST DE TRACCIÓN UNIAXIAL *IN VITRO* Y DE INDENTACIÓN *IN VIVO*

Para ambos tipos de test, todos los valores registrados para el análisis estadístico, incluyendo los módulos elásticos, mostraron una distribución normal ( $p>0.05$ ).

En los test de tracción uniaxial *in vitro*, todos los test individuales realizados mostraron un comportamiento no lineal, por lo que se obtuvieron los módulos elásticos medios ( $\pm$  desviación estándar) para PreCXL ( $78.894 \pm 12.775$  MPa), PostCXL-7d ( $105.610 \pm 18.950$  MPa) y PostCXL-56d ( $97.152 \pm 11.995$  MPa). En el análisis estadístico de los mismos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre PreCXL/PostCXL-7d ( $p=0.037$ ) y PreCXL/PostCXL-56d ( $p=0.015$ ), pero no entre PostCXL-7d/PostCXL-56d ( $p=0.321$ ).

En lo que respecta al comportamiento mecánico, a diferencia de los test de indentación *in vivo*, el día 7 tras la aplicación de *crosslinking* el tejido corneal mostró el comportamiento más rígido, manteniéndose prácticamente constante hasta el día 56 tras el tratamiento (Figura 8). La Figura 9 muestra los valores medios de tracción (MPa) obtenidos para la carga del último ciclo en los test de tracción uniaxial *in vitro*.

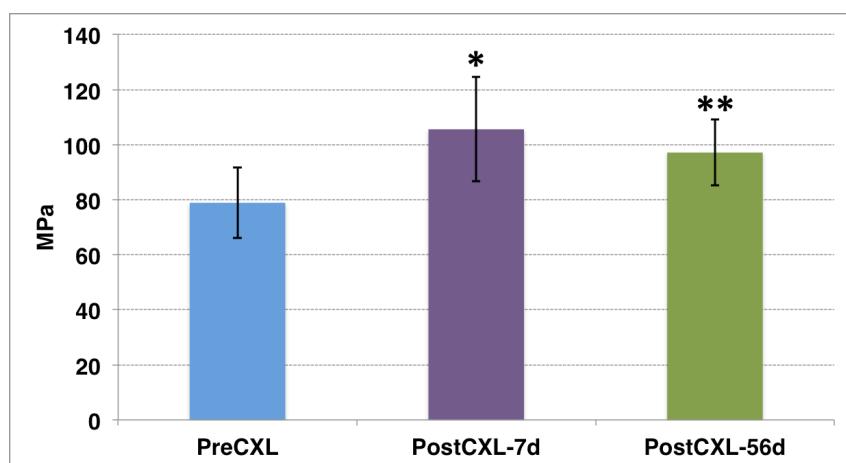


Figura 8. Valores medios de los módulos elásticos ( $\pm$  desviación estándar) para los test experimentales de tracción uniaxial *in vitro* antes (PreCXL,  $n=8$ ) y después del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal (PostCXL-7d,  $n=8$ ; PostCXL-56d,  $n=8$ ). \* PreCXL/PostCXL-7d ( $p=0,037$ ). \*\* PreCXL/PostCXL-56d ( $p=0,015$ ).

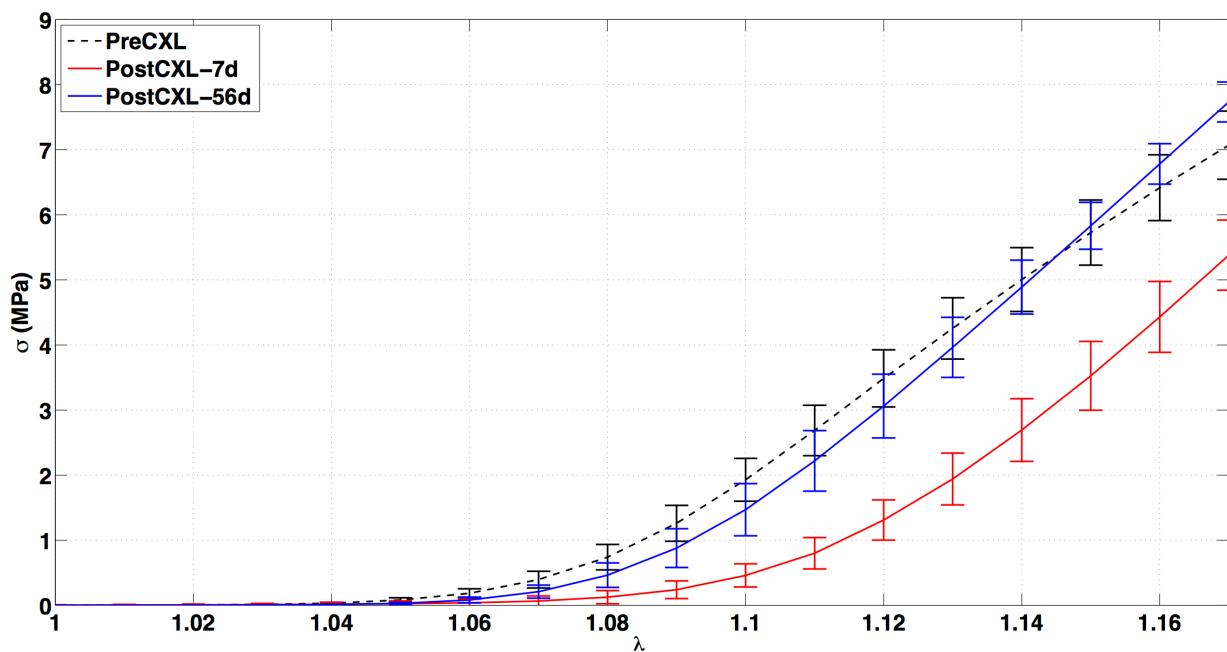


Figura 9. Valores medios de tracción (MPa) de los test experimentales de tracción uniaxial *in vitro* antes (PreCXL, n=8) después del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal (PostCXL-7d, n=8; PostCXL-56d, n=8).

En los test de indentación *in vivo*, para los valores de carga (N) a una deformación de  $\delta=0.5$  mm y  $\delta=1$  mm, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los test antes y después del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal excepto entre PreCXL y PostCXL-56d.

En lo que respecta al comportamiento mecánico, el día 7 tras la aplicación de *crosslinking* el tejido corneal mostró el comportamiento más elástico, observándose después una recuperación progresiva del espesor corneal hasta el día 56 tras el tratamiento, incluso incrementándose la rigidez con respecto al PreCXL (Figure 10). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el comportamiento mecánico antes y a los 56 días tras el *crosslinking*, por lo que ambos comportamientos mecánicos pueden considerarse similares.

En la Tabla I se muestran todos los valores de  $p$  obtenidos de la comparación estadística del test de indentación *in vivo* antes y después del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal.

Tabla I. Valores de  $p$  tras el análisis estadístico de los valores de carga (N) a  $\delta=0.5$  mm y  $\delta=1$  mm tras los test de indentación *in vivo*. Los valores estadísticamente significativos aparecen subrayados.

Indentación <i>in vivo</i>		
	$\delta=0.5$	$\delta=1$
$p$ (Pre, 7d)	<u>0.004</u>	<u>0.000</u>
$p$ (Pre, 21d)	<u>0.000</u>	<u>0.005</u>
$p$ (Pre, 56d)	0.085	0.425
$p$ (7d, 21d)	<u>0.000</u>	<u>0.012</u>
$p$ (7d, 56d)	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>
$p$ (21d, 56d)	<u>0.000</u>	0.003

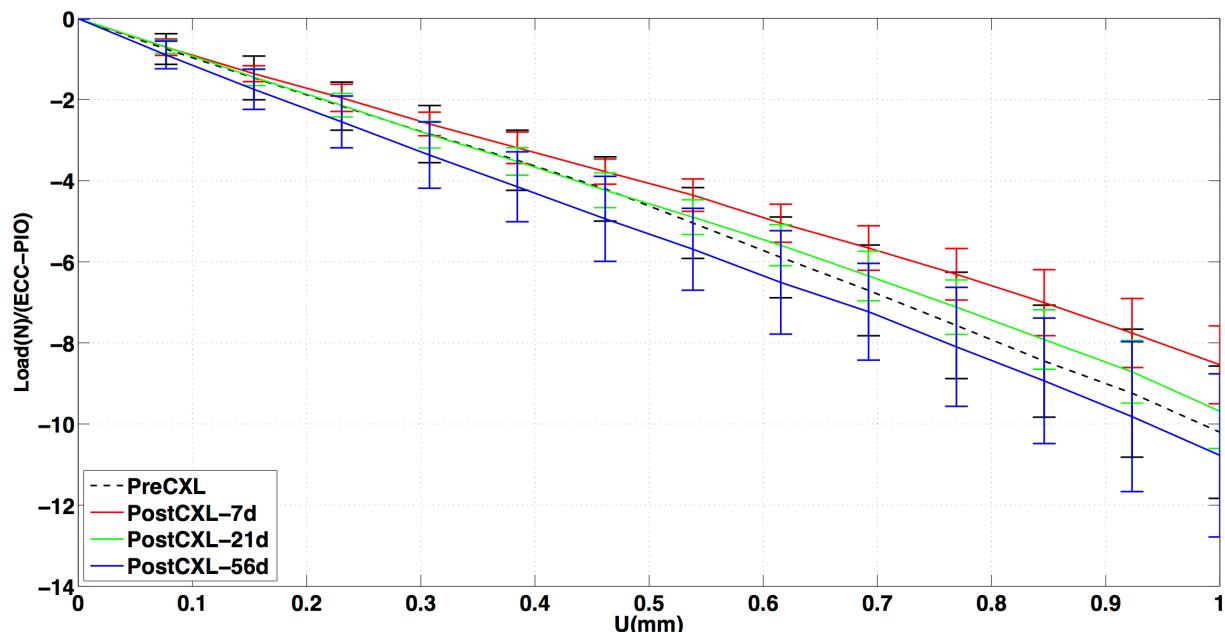


Figura 10. Valores medios de carga (N) de los test experimentales de indentación *in vivo* antes (PreCXL, n=24) y después del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal (PostCXL-7d, n=16; PostCXL-21d, n=8; PostCXL-56d, n=8).

## ESPESOR CORNEAL CENTRAL (ECC) Y PRESIÓN INTRAOCULAR (PIO)

En la Tabla II se muestran los valores medios ( $\pm$  desviación estándar) del espesor corneal central (ECC) y de la presión intraocular (PIO) antes de la realización de los test de indentación *in vivo* y de tracción uniaxial *in vitro* para los ojos control (PreCXL) y a los días

7 (PostCXL-7d), 21 (PostCXL-21d) y 56 (PostCXL-56d) después del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal.

En el análisis estadístico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la PIO antes y después de realizar el tratamiento a los 7, 21 y 56 días. Sin embargo, en ambos tipos de test se observaron diferencias estadísticamente significativas en el ECC, a los 56 días tras la realización del tratamiento respecto al ECC antes y a los 7 y 21 días de aplicarlo, pero no entre éstos (Tabla III).

Tabla II. Valores medios del espesor corneal central (ECC;  $\mu\text{m}$ ) y de la presión intraocular (PIO; mm Hg) ( $\pm$  desviación estándar).

		PreCXL	PostCXL-7d	PostCXL-21d	PostCXL-56d
<b>Indentación</b> <i>in vivo</i>	ECC	381.13 $\pm$ 2.10	382.13 $\pm$ 1.81	383.75 $\pm$ 1.75	401.13 $\pm$ 7.42
	PIO	12.10 $\pm$ 1.29	12.64 $\pm$ 1.63	12.00 $\pm$ 1.23	11.08 $\pm$ 2.88
<b>Tracción</b>					
<b>uniaxial</b>	ECC	382.00 $\pm$ 2.37	383.83 $\pm$ 2.14	-----	402.17 $\pm$ 8.38
<i>in vitro</i>					

Tabla III. Valores de *p* tras el análisis estadístico del ECC ( $\mu\text{m}$ ) y la PIO (mm Hg). Los valores estadísticamente significativos aparecen subrayados.

	Indentación <i>in vivo</i>	Tracción uniaxial	
		PIO	ECC
<i>p</i> (Pre, 7d)	0.413	0.406	0.304
<i>p</i> (Pre, 21d)	0.056	1.000	-----
<i>p</i> (Pre, 56d)	<u>0.000</u>	0.421	<u>0.002</u>
<i>p</i> (7d, 21d)	0.142	0.240	-----
<i>p</i> (7d, 56d)	<u>0.000</u>	0.255	<u>0.005</u>
<i>p</i> (21d, 56d)	<u>0.000</u>	0.425	-----

## COMPARACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde el punto de vista biomecánico, en el presente estudio se observa un comportamiento del tejido corneal claramente diferenciado en función del tipo de ensayo utilizado para su caracterización.

Tras la realización del ensayo de indentación *in vivo*, a los días 7 y 21 después del tratamiento mediante *crosslinking*, el tejido corneal mostró un comportamiento más elástico respecto del mostrado previamente a la aplicación de éste (PreCXL), mientras que a los 56 días tras el tratamiento presentó un comportamiento más rígido. Por el contrario, tras la realización del ensayo de tracción uniaxial *in vitro*, al día 7 después del tratamiento mediante *crosslinking*, el tejido corneal mostró un comportamiento más rígido (mayor módulo elástico o pendiente) respecto del mostrado previamente a la aplicación de éste (PreCXL), manteniéndose prácticamente inalterado hasta los 56 días.

De las principales capas que constituyen la córnea, principal elemento refractivo del ojo, el estroma o capa media supone un 90% del espesor total, determinando en mayor medida sus propiedades biomecánicas. Se compone fundamentalmente de fibras de colágeno (dispuestas en forma de lamelas), matriz extracelular, fluido intersticial y queratocitos (células responsables de la producción de dichas fibras de colágeno)<sup>6,62</sup>. Así, para establecer adecuadamente las propiedades biomecánicas de la córnea, resulta estrictamente necesaria la utilización de diferentes tipos de ensayo, cada uno de los cuales determina de forma más precisa el comportamiento mecánico de uno o varios de sus componentes. El ensayo de tracción uniaxial, como su propio nombre indica, somete al tejido corneal a un esfuerzo de tracción-deformación mediante el desplazamiento de uno de sus extremos y este tipo de esfuerzo corresponde al que soportan las fibras de colágeno en condiciones fisiológicas. Sin embargo, el ensayo de indentación somete al tejido corneal a una deformación generada mediante un esfuerzo de compresión, mayoritariamente soportado por las células estromales o queratocitos en condiciones normales.

Se ha demostrado un mayor efecto del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal en el estroma corneal anterior (200-320 µm), lo que genera un fenómeno citotóxico que afecta en mayor medida a los queratocitos situados en dicha zona, aunque reduce el número celular absoluto de la totalidad del estroma por mecanismos de apoptosis y necrosis

celular<sup>10,65</sup>. En el presente estudio, este efecto se ve claramente determinado por el ensayo de indentación que, como se ha citado, somete a las células a un esfuerzo de tracción de manera que a los días 7 y 21 tras el tratamiento, debido a la muerte celular generada, se observa un comportamiento corneal mecánico más elástico. Wollensak y cols. (2007)<sup>66</sup> determinaron mediante inmunofluorescencia y recuento celular que tras la realización de *crosslinking* estándar durante 30 minutos en córneas de conejo, sólo a partir de las 4-6 semanas se observaba una recuperación de la población normal de queratocitos en el estroma corneal. Sin embargo, en el presente estudio este hecho se observó desde el punto de vista mecánico a los 56 días, mostrando el tejido corneal un comportamiento más rígido, aunque no puede asegurarse que éste sea el momento en el que la población celular estromal se haya recuperado completamente, ya que no se valoró el comportamiento mecánico inmediatamente anterior (desde los 21 a 56 días). Así, se piensa que esta repoblación completa ha podido tener lugar antes de los 56 días, ya que en este momento se observó un comportamiento ligeramente más rígido que antes de la aplicación del tratamiento, aunque no fue estadísticamente significativo.

Otro de los efectos mejor descritos del *crosslinking* es el incremento de la rigidez corneal<sup>19,26,30</sup>. Como se ha comentado, este parámetro está influenciado directamente por la estructura y disposición de las fibras de colágeno estromal, y se ha determinado tradicionalmente mediante extensometría de probetas (tracción)<sup>30</sup>. En cuanto a la orientación de dichas fibras, Hayes y cols. (2007)<sup>64</sup> observaron mediante difracción de rayos X que en el conejo siguen una distribución circular, al igual que en el ratón y en el cerdo. Sin embargo, en el humano siguen una distribución perpendicular en dirección nasal-temporal y dorsal-ventral. De esta manera, aunque la orientación teórica del corte de las probetas en el conejo sería indiferente debido a su disposición circular, en el presente estudio se estandarizó mediante la sección siempre vertical en todas ellas. El comportamiento mecánico observado mediante los ensayos de tracción uniaxial corresponde con el descrito para el conejo en estudios del efecto del *crosslinking* a medio y largo plazo en esta especie<sup>7,47</sup>, mostrando un incremento de la rigidez (mayor módulo elástico) tras la aplicación del tratamiento a los días 7 y 56, observando una ligera disminución de la misma entre ambos días sin llegar a ser estadísticamente significativa.

En cuanto al efecto descrito del *crosslinking* sobre el diámetro de las fibras de colágeno, Wollensak y cols. (2004)<sup>58</sup> describieron un incremento significativo tras la aplicación de éste.

No obstante, aunque esto no ha podido ser descrito en el presente estudio, se ha observado un incremento significativo del espesor corneal total el día 56 tras el tratamiento mediante *crosslinking*, si bien se cree que puede estar asociado directamente con el crecimiento de los animales de experimentación empleados, descartando el edema corneal secundario a la lesión inicial realizada para llevar a cabo el tratamiento, ya que no se observó incremento significativo ni signos de edema corneal a los 7 días después de la aplicación de éste.

Los modelos animales experimentales son utilizados en general para la validación de la gran mayoría de los tratamientos médico-quirúrgicos corneales que posteriormente son aplicados en el ser humano. Así, son numerosas las especies que se emplean en función de la patología y tratamiento a realizar, aunque el conejo es una de las más utilizadas debido a su fácil manejo y bajo coste económico de mantenimiento. Empero, toda extrapolación entre especies requiere una validación y comparación cuidadosa, no sólo debido a las diferencias en la evolución y patogenia de la patología corneal estudiada o a la respuesta al tratamiento valorado entre las especies escogidas, sino por las diferencias propias entre las propiedades de la estructura corneal entre éstas. De este modo, el conejo constituye un modelo animal experimental muy adecuado para la valoración de distintas patologías corneales como la queratomalacia o la queratitis infecciosa. Sin embargo, aunque el conejo presenta un espesor corneal similar al que presenta el ser humano en casos de queratocono, menor de 400  $\mu\text{m}$ , esta patología cursa inicialmente con una alteración de la respuesta mecánica, inflamatoria y estructural de la córnea que no puede inducirse en el animal de experimentación. Por ello, los efectos esperados tras la aplicación de *crosslinking* en casos de queratocono serían ligeramente diferentes, aunque con un mayor grado de mejoría esperado que los observados tras su aplicación en animales de experimentación, en los que se parte de una córnea todavía sana.

---

## CONCLUSIONES

---

- ✓ El ensayo de indentación *in vivo* es un método complementario, aunque no alternativo, al ensayo de tracción uniaxial *in vitro*, lo que permite mejorar la caracterización de las propiedades biomecánicas corneales mediante la combinación de ambos.

- ✓ El ensayo de indentación *in vivo* constituye una adecuada forma de monitorización a medio y largo plazo de diferentes tratamientos y patologías corneales desde el punto de vista biomecánico, reduciendo la necesidad de disponer de muestras *in vitro* y por tanto disminuyendo el número de individuos utilizados en estudios experimentales.
- ✓ A nivel corneal, el ensayo de indentación *in vivo* permite valorar con éxito el esfuerzo de compresión al que se somete a la población celular del estroma corneal, complementando la valoración del esfuerzo de tracción-deformación al que se someten las fibras de colágeno que componen dicha capa mediante el ensayo de tracción *in vitro*.
- ✓ El conejo no constituye un modelo experimental apto para la extrapolación de los resultados del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal en casos de queratocono, ya que esta enfermedad se origina por una anomalía celular y estructural de las fibras de colágeno que componen el estroma corneal, situación que no puede ser inducida en córneas sanas de conejo pese a presentar un espesor similar. Pero sí supone un modelo animal experimental adecuado para el tratamiento de otras ectasias corneales como la queratomalacia o la queratitis infecciosa.

#### **FUTUROS OBJETIVOS Y LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**

Desde el punto de vista mecánico y tras valorar los resultados obtenidos en el presente estudio, resulta esencial la utilización de protocolos multi-ensayo que permitan una caracterización completa de las propiedades biomecánicas corneales. Sin embargo, la córnea está sometida tanto a esfuerzos externos (valorados mediante ensayos de indentación) y laterales (valorados mediante ensayos de tracción), como a esfuerzos internos derivados, por ejemplo, del incremento de presión intraocular en casos de glaucoma o durante cirugías intraoculares. Así, el desarrollo de ensayos de inflado que permitan simular este tipo de esfuerzos internos resulta esencial para complementar la caracterización corneal.

Desde el punto de vista clínico, los beneficios psicosociales y económicos que el *crosslinking* ofrece en la clínica diaria, hacen de este tipo de tratamiento una terapia alternativa a la necesidad de realizar intervenciones quirúrgicas más agresivas como la implantación de anillos intraestromales o la realización de trasplantes corneales de espesor parcial o completo. Además, es una técnica mínimamente invasiva, de bajo coste y que

permite dar un servicio ambulatorio que no requiere hospitalización, lo que la hace óptima para su uso también en animales de compañía. Así, recientemente está siendo utilizada con éxito en pequeños animales para el tratamiento de patologías corneales como la queratomalacia y la queratopatía bullosa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malik NS, et al. Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes. *Biochim Biophys Acta*, 1992; 1138(3): 222-8.
2. Dominiczak, MH. The significance of the products of the Maillard reaction in diabetes. *Diabet Med*, 1991; 8(6): 505-16.
3. Lee HL, Orlowski JA, Rogers BJ. A comparison of ultraviolet-curing and self-curing polymers in preventive, restorative and orthodontic dentistry. *Int Dent J*, 1979; 26(2): 134-51.
4. Elsheikh A, Wang D, Brown M, et al. Assessment of corneal biomechanical properties and their variation with age. *Curr Eye Res* 2007; 32: 11-9.
5. Knox Cartwright NE, Tyrer JR, Marshall J. Age-related differences in the elasticity of the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 52: 4324-9.
6. Iseli HP, Hafezi F, Mrochen M, Seiler T. Estado actual de la reticulación del colágeno corneal. En: Cezón J, editores. *Técnicas de modelado corneal, desde la Ortoqueratología hasta el Cross-Linking*. Sevilla: SECOIR; 2009. p. 387.
7. Wollensak G, Iomdina E. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement. *J Cataract Refract Surg* 2009; 35(3): 540-546.
8. Spoerl E, Schreiber J, Hellmund K, et al. [Studies on the stabilization of the cornea in rabbits]. *Ophthalmologe* 2000; 97: 203-6. German.
9. Hayes S, O'Brart DP, Lamdin LS, et al. Effect of complete epithelial debridement before riboflavin-ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34: 657-61.
10. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin crosslinking of the cornea. *Cornea* 2007; 26: 385-9.

11. Pflugfelder SC, Liu Z, Feuer W, Verm A. Corneal thickness indices discriminate between keratoconus and contact lens-induced corneal thinning. *Ophthalmology* 2002; 109: 2336-41.
12. Schreiber J. Verfestigung der Hornhaut durch UVA 365 nm und Riboflavin oder durch Glutaraldehyd. Thesis, TU Dresden 2003. German.
13. Wollensak G, Aurich H, Wirbelauer C, Sel S. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36: 114-20.
14. Iseli HP, Popp M, Seiler T, et al. Laboratory measurement of the absorption coefficient of riboflavin for ultraviolet light (365 nm). *J Refract Surg* 2011; 27: 195-201.
15. Huang R, Choe E, Min DB. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. *J Food Sci* 2004; 69: C726-32.
16. Hafezi F. Limitation of collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution: failure in an extremely thin cornea. *Cornea* 2011; 30: 917-9.
17. Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 437-43.
18. Raiskup F, Spoerl E. Corneal cross-linking with hypo-osmolar riboflavin solution in thin keratoconic corneas. *Am J Ophthalmol* 2011; 152: 28-32
19. Raiskup F, Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. Part I. Principles. *Ocul Surf* 2013; 11(2): 65-74.
20. Kaya V, Utine CA, Yilmaz OF. Efficacy of corneal collagen crosslinking using a custom epithelial debridement technique in thincorneas: a confocal microscopy study. *J Refract Surg* 2011; 27: 444-50.
21. Sliney D, Aron-Rosa D, DeLori F, et al. Adjustment of guidelines for exposure of the eye to optical radiation from ocular instruments: statement from a task group of the International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP). *Appl Opt* 2005; 44: 2162-76.
22. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin crosslinking of the cornea. *Cornea* 2007; 26(4): 385-389.
23. Wollensak G, Sporl E, Reber F, et al. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res* 2003; 35: 324-8.
24. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135(5): 620-627.

25. Meek KM, Hayes S. Corneal cross-linking: a review. *Ophthalmic Physiol Opt* 2013; 33(2): 78-93.
26. 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.
27. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*, 2004; 29(1): 35-40.
28. Wollensak G, Aurich H, Pham D-T, Wirbelauer C. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33: 516–521.
29. Stewart JM, Schultz DS, Lee OT, Trinidad ML. Collagen cross-links reduce corneal permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(4): 1606-1612.
30. Besthawi IM, O'Donnell C, Radhakrishnan H. Biomechanical properties of corneal tissue after ultraviolet-A-riboflavin crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2013; 39(3): 451-462.
31. Martins SA, Combs JC, Noguera G, et al. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(8): 3402-3408.
32. Makdoumi K, Backman A, Mortensen J, Crafoord S. Evaluation of antibacterial efficacy of photo-activated riboflavin using ultraviolet light (UVA). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 248: 207-12.
33. Kymionis GD, Grentzelos MA, Portaliou DM, Karavitaki AE, Krasia MS, Dranidis GK, Kozobolis VP. Photorefractive keratectomy followed by same-day corneal collagen crosslinking after intrastromal corneal ring segment implantation for pellucid marginal degeneration. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36(10): 1783-1785.
34. 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): 2035-2040.
35. Krueger RR, Ramos-Esteban JC, Kanellopoulos AJ. Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: laboratory investigation and first clinical case. *J Refract Surg* 2008; 24(7): S730-S736.
36. Yeung SN, Ku JY, Lichtinger A, Low SA, Kim P, Rootman DS. Efficacy of single or paired intrastromal corneal ring segment implantation combined with collagen crosslinking in keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2013 ;39(8): 1146-1151.
37. Randleman JB. Post-laser in-situ keratomileusis ectasia: current understanding and future directions. *Curr Opin Ophthalmol* 2006; 17: 406-12.

38. Makdoumi K, Mortensen J, Crafoord S. Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. *Cornea* 2010; 29: 1353-8.
39. Makdoumi K, Mortensen J, Sorkhabi O, et al. UVA-riboflavin photochemical therapy of bacterial keratitis: a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 250: 95-102.
40. Ghanem RC, Santhiago MR, Berti TB, et al. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A in eyes with pseudophakic bullous keratopathy. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36: 273-6.
41. Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, et al. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 2537-46.
42. Yaron S, Rabinowitz, MD. Keratoconus. *Survey Ophthalmol* 42 (4) January–February 1998: 297-312.
43. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998; 66:97–103.
44. Ahearne M, Yang Y, Then KY, Liu K- K. Non-destructive mechanical characterisation of UVA/riboflavin crosslinked collagen hydrogels. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 268–271.
45. Kling S, Pérez-Escudero A, Merayo-Lloves J, Marcos S. Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 3961–3968.
46. Lanchares E, Del Buey MA, Cristóbal JA, Lavilla L, Calvo B. Biomechanical property analysis after corneal collagen cross-linking in relation to ultraviolet A irradiation time. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011; 249: 1223–1227.
47. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta Ophthalmol* 2009; 87: 48–51.
48. 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: 279–283.
49. Akhtar R, Schwarzer N, Sherratt MJ, Watson REB, Graham HK, Trafford AW, Mummary PM, Derby B. Nanoindentation of histological specimens: mapping the elastic properties of soft tissues. *J Mater Res* 2009; 24: 638–646.
50. Akhtar R, Sherratt MJ, Watson REB, Kundu T, Derby B. Mapping the micromechanical properties of cryo-sectioned aortic tissue with scanning acoustic microscopy. *Mater Res Soc Symp Proc* 2009; 1132E: 1132-Z11-03-07.

51. Beshtawi IM, Akhtar R, Hillarby C, O'Donnell C, Zhao X, Brahma A, Carley F, Derby B, Radhakrishnan H. Scanning acoustic microscopy for mapping the micro-elastic properties of human corneal tissue. In press, *Curr Eye Res* 2013.
52. Rupin F, Saï A, Dalmas D, Peyrin F, Haupert S, Raum K, Barthel E, Boivin G, Laugier P. Assessment of microelastic properties of bone using scanning acoustic microscopy: a face-toface comparison with nanoindentation. *Jpn J Appl Phys* 2009; 48:07GK01.
53. Goldich Y, Barkana Y, Morad Y, Hartstein M, Avni I, Zadok D. Can we measure corneal biomechanical changes after collagen cross-linking in eyes with keratoconus? A pilot study. *Cornea* 2009; 28: 498–502.
54. Luce DA. Determining in vivo biomechanical properties of the cornea with an ocular response analyzer. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31: 156–162.
55. Sedaghat M, Naderi M, Zarei-Ghanavati M. Biomechanical parameters of the cornea after collagen crosslinking measured by waveform analysis. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36: 1728–1731.
56. Meek KM, Fullwood NJ. Corneal and scleral collagensda microscopist's perspective. *Micron* 2001; 32: 261–272.
57. Meisenberg G, Simmons WH. *Principles of Medical Biochemistry*, 2nd ed. St. Louis, MO, Mosby, 2006.
58. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 2004; 23: 503–507.
59. 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: 2180–2186.
60. Rehany U, Lahav M, Shoshan S. Collagenolytic activity in keratoconus. *Ann Ophthalmol* 1982; 14: 751–754.
61. Huang Y, Meek KM. Swelling studies on the cornea and sclera: the effects of pH and ionic strength. *Biophys J* 1999; 77: 1655–1665.
62. Hatami-Marbini H. Viscoelastic shear properties of the corneal stroma. *J Biomechanics*. 2014; 47(3): 723-728.
63. Hatami-Marbini H. Hydration dependent viscoelastic tensile behavior of cornea. *Ann Biomed Eng*. 2014; 42(8): 1740-1748.
64. Hayes S, Boote C, Lewis J, Sheppard J, Abahussin M, Quantock AJ, Purslow C, Votruba M, Meek KM. *Anat rec*. 2007; 290: 1542-1550.

65. Hovakimyan M, Guthoff R, Knappe S, Zhivotov A, Wree A, Krüger A, Heisterkamp A, Stachs O. Short-term corneal response to cross-linking in rabbit eyes assessed by in vivo confocal laser scanning microscopy and histology. *Cornea* 2011; 30: 196-203.
66. Wollensak G, Iomdina E, Dittert D-D, Herbst H. Wound healing in the rabbit cornea after corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA. *Cornea* 2007; 26: 600-605.

---

## A p é n d i c e

---

### ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Esquema de la reacción bioquímica que da lugar a la generación de radicales libres de oxígeno y la formación de enlaces covalentes entre los grupos amino y aldehído de las cadenas laterales de las fibras de colágeno estromal.....  
Fuente: Montero J. Concepto de córnea sana. En: Cezón J, editores. Técnicas de modelado corneal, desde la Ortoqueratología hasta el Cross-Linking. Sevilla: SECOIR; 2009. p. 387. / Raiskup F., Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. The Ocular Surface 2013; 11(2): 65-74.
  
- FIGURA 2. Equipos para el tratamiento mediante *crosslinking* de colágeno corneal estándar (izquierda; UVA CBM-X-Linker, CSO, Scandicci Firenze, Italia) y acelerado (derecha; KXL AVEDRO, Avedro Inc., Waltham, MA, EE.UU.) .....  
Fuente: [www.carletonltd.com](http://www.carletonltd.com) / [www.avedro.com](http://www.avedro.com)
  
- FIGURA 3. Esquema del efecto fundamental del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal. Número de enlaces covalentes entre las fibras de colágeno y rigidez corneal antes (izquierda) y después (derecha) de su aplicación .....  
Fuente: Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin ultraviolet A induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. American Journal of Ophthalmology 2003; 135(5): 620-627. / [www.visioncamberwell.com.au](http://www.visioncamberwell.com.au)
  
- FIGURA 4. Posicionamiento del paciente en casos de tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal .....  
Fuente: [www.curielvision.com](http://www.curielvision.com) / [www.peschkemed.com](http://www.peschkemed.com)
  
- FIGURA 5. Tratamiento mediante CXL del colágeno corneal y material necesario para su realización .....
  
- FIGURA 6. Test de indentación *in vivo*. Posicionamiento del animal e indentación corneal hasta una deformación máxima de 1 mm .....

- FIGURA 7. Test de tracción uniaxial *in vitro*. Sección de la probeta y aplicación de ciclos de tracción-relajación hasta alcanzar deformaciones del 3, 6, 12% de la longitud inicial y la posterior rotura de la misma .....
- FIGURA 8. Valores medios de los módulos elásticos ( $\pm$  desviación estándar) para los test experimentales de tracción uniaxial *in vitro* antes (PreCXL, n=8) y después del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal (PostCXL-7d, n=8; PostCXL-56d, n=8). \*PreCXL/PostCXL-7d (p=0,037). \*\*PreCXL/PostCXL-56d (p=0,015) .....
- FIGURA 9. Valores medios de tracción (MPa) de los test experimentales de tracción uniaxial *in vitro* antes (PreCXL, n=8) después del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal (PostCXL-7d, n=8; PostCXL-56d, n=8) .....
- FIGURA 10. Valores medios de carga (N) de los test experimentales de indentación *in vivo* antes (PreCXL, n=24) y después del tratamiento mediante *crosslinking* del colágeno corneal (PostCXL-7d, n=16; PostCXL-21d, n=8; PostCXL-56d, n=8) .....

## ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA I. Valores de  $p$  tras el análisis estadístico de los valores de carga (N) a  $\delta=0.5$  mm y  $\delta=1$  mm tras los test de indentación *in vivo*. Los valores estadísticamente significativos aparecen subrayados .....
- TABLA II. Valores medios del espesor corneal central (ECC;  $\mu\text{m}$ ) y de la presión intraocular (PIO; mm Hg) ( $\pm$  desviación estándar) .....
- TABLA III. Valores de  $p$  tras el análisis estadístico del ECC ( $\mu\text{m}$ ) y la PIO (mm Hg). Los valores estadísticamente significativos aparecen subrayados .....