

Cambios histológicos de las fibras de colágeno corneal tras aplicación de crosslinking (Modelo en conejos)

Mayor M.C. Héctor Gustavo **Ramírez-González**,* Mayor M.C. Gabriel Antonio **Sierra-Acevedo****

Hospital Central Militar/Escuela Militar de Graduados de Sanidad/Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

RESUMEN

Introducción. Recientemente se ha desarrollado el Crosslinking para el tratamiento de las ectasias corneales, principalmente usada en el queratocono, dicho tratamiento consiste en la aplicación de radiación ultravioleta tipo A en córneas impregnadas con riboflavina antes y durante la aplicación de la radiación. Las mediciones biomecánicas *in vitro*, demuestran un incremento significativo en la resistencia biomecánica de la córnea sometida al cross-linking y en un estudio reciente se demostró el incremento en el diámetro de las fibras de colágeno.

Objetivo. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de este nuevo procedimiento en el grosor de las fibras de colágeno de la córnea de conejo a la semana y a los tres meses tras su aplicación.

Material y método. Se realizó el cross-linking en las córneas de los ojos izquierdos de ocho conejos albinos de Nueva Zelanda, mediante la instilación de riboflavina fotosensibilizadora, previa desepitelización y exposición a rayos UVA (370 nm, 3 mW/cm²) durante 30 minutos. Los ojos derechos de control no fueron tratados, cuatro conejos fueron sacrificados a la semana y los otros cuatro a los tres meses, se tomaron cuatro córneas derechas no tratadas como grupo control y las cuatro córneas izquierdas de los conejos sacrificados a la semana y las cuatro córneas izquierdas de los sacrificados a los tres meses, se procesaron para obtener cortes ultrafinos para ser evaluados morfométricamente mediante microscopía electrónica, con la ayuda de un software informático, se midió el grosor de 50 fibras de colágeno por ojo, total 200 mediciones por grupo.

Resultados. Se utilizó el método estadístico Z, con lo que se encontró diferencia estadísticamente significativa en el aumento del grosor de las fibras de colágeno corneal de conejo, de los dos grupos tratados en relación al grupo control. En cuanto al control y el grupo sacrificado a la semana el resultado fue: $Z = 13.47$; $p < 0.05$, en lo que respecta al control y el grupo sacrificado a los tres meses fue: $Z = 7.402$; $p < 0.05$. Al realizar la comparación entre el grupo sacrifi-

Histological changes of the corneal collagen fibers after application of crosslinking (Model in rabbits)

SUMMARY

Introduction. Recently, crosslinking has been developed for the treatment of corneal ectasia, keratoconus primarily used in such treatment involves the application of ultraviolet radiation type A cornea saturated with riboflavin before and during application of radiation, biomechanical measurements *in vitro*, show a significant increase in biomechanical strength of the cornea subject to cross-linking and a recent study showed an increase in the diameter of collagen fibers.

Objective. The aim of this study was to evaluate the effect of this new procedure in the thickness of the collagen fibers of the cornea of rabbit a week and 3 months after cross-linking application.

Material and methods. We performed cross-linking in the corneas of the left eyes of 8 New Zealand albino rabbits by the instillation of the photosensitizer riboflavin, previous desepithelization and exposure to UVA (370 nm, 3 mW/cm²) for 30 minutes. The right eyes of control, were not treated, 4 rabbits were sacrificed a week and the other 4 at 3 months, 4 corneas were taken right untreated control group and 4 left corneas of rabbits killed a week and 4 corneas left of the sacrificed at 3 months, were processed to obtain ultrathin sections to be evaluated morphometrically by electron microscopy, with the help of computer software, we measured the thickness of collagen fibers 50 for an eye, total 200 measurements per group.

Results. We used the statistical method Z, which found statistically significant difference in increasing the thickness of the corneal collagen fibers of rabbit, the two treated groups in relation to the control group. As for the control and the group killed a week the result was: $Z = 13.47$, $p < 0.05$, with respect to the control and the group sacrificed at 3 months was: $Z = 7.402$, $p <$

* Especialista en Oftalmología, Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ** Oftalmólogo, subespecialista en córnea. Servicio de Oftalmología del Hospital Central Militar-Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Escuela Militar de Graduados de Sanidad/Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Correspondencia:

Mayor M.C. Héctor Gustavo Ramírez-González.

Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas S/N Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F. Correo electrónico: hecgusrg@hotmail.com

Recibido: Agosto 12, 2012.

Aceptado: Enero 10, 2013.

cado a la semana y el sacrificado a los tres meses se encontró una disminución estadísticamente significativa del engrosamiento de las fibras de colágeno corneal de este último grupo con el siguiente resultado: $Z = 3.9$; $p < 0.05$.

Palabras clave: Crosslinking, Ectasia, UVA.

0.05. To make the comparison between the group killed a week and sacrificed at 3 months was found a statistically significant thickening of the corneal collagen fibers of the latter group with the following results: $Z = 3.9$, $p < 0.05$.

Key words: Crosslinking, Ectasia, UVA.

Introducción

Recientemente se ha desarrollado el Crosslinking para el tratamiento de las ectasias corneales, principalmente en el queratocono, dicho procedimiento consiste en aplicar radiación ultravioleta tipo A en la córnea previamente impregnada con riboflavina, así como durante la radiación, lo anterior incrementa la resistencia biomecánica de la córnea demostrado por mediciones biomecánicas, en un estudio reciente se demostró el incremento en el diámetro de las fibras de colágeno.

El “crosslinking” fue introducido por Theo Seiler, Eberhard Spörl y Gregor Wollensak de Berlín, Alemania, en el 2003 para aumentar la dureza de la córnea y tratar de detener la progresión del queratocono, encontraron que la podían aumentar en 300%. Cuando hablamos de “crosslinking” corneal hablamos de un reforzamiento de la córnea al incrementar el número de uniones entre las moléculas de colágeno al inducir enlaces covalentes entre las moléculas de colágeno. Estas nuevas uniones hacen la cornea menos elástica y aumentan su resistencia al estiramiento, en general, es un tipo de reacción química que produce nuevos enlaces que incrementan la resistencia de un tejido.^{1,2}

El colágeno es el componente principal de la córnea y también es el responsable de las características de la córnea sana. La resistencia de las fibras de colágeno depende de la creación de zonas de unión entre las moléculas de colágeno y de su distribución. Se sabe que la resistencia del tejido corneal que sufre de queratocono disminuye 50% en comparación con aquella de una córnea sana y eso explica una córnea estructuralmente “débil”, que tiende a adelgazarse y a formar un abultamiento en forma de cono.³

El “crosslinking” en general es un tipo de reacción química que produce nuevos enlaces que incrementan la resistencia de un tejido. Cuando hablamos de crosslinking corneal hablamos de un reforzamiento de la córnea al incrementar el número de uniones entre las moléculas de colágeno. Estas nuevas uniones hacen la cornea menos elástica y aumentan su resistencia al estiramiento.^{2,3}

Un estudio demostró un incremento en el diámetro de las fibras de colágeno corneal, tras la aplicación del “crosslinking”, siendo el efecto más fuerte en la mitad anterior del estroma, debido a la rápida disminución del reflejo de los rayos UVA a través del estroma corneal, como resultado de una absorción de los rayos UVA intensificada con riboflavina.⁴

Métodos

Se organizaron dos grupos de cuatro conejos albinos de Nueva Zelanda cada uno, en cada grupo se trató el ojo izquierdo y el derecho fue el control, se sacrificaron a la semana y a los tres meses, respectivamente, como sigue:

1. Aplicación de pilocarpina al 4% una hora previa a la anestesia.
 2. Anestesia de los conejos con Ketamina al 10% (0.25 mg/kg) y Xilazine (0.5 mg/kg).
 3. Aplicación de anestesia tópica 15 minutos antes del procedimiento, así como desepitelización de los 5 mm centrales de la córnea.
- Aplicación de Riboflavina al 0.1%, colirio 15 minutos antes de la radiación cada 5 minutos y cada 3 minutos durante la radiación, hasta completar 30 minutos.
5. Exposición de uno de los ojos (izquierdo) de cada conejo a radiación UVA con siguientes parámetros (370 nm, 3 mW/cm²) a una distancia de 1 cm por 30 minutos (*Figura 1*).
 6. Sacrificio de los animales con dosis letal de Pentobarbital (consistente en el doble de la dosis habitual para anestesia general): en el caso del primer grupo a la semana y del segundo a los tres meses de la aplicación del Crosslinking.
 7. Obtención de las córneas, las cuales se fijaron con Glutaraldehído al 2.5% en Buffer de PBS al 0.1M a 4 °C, después de la fijación se obtuvieron muestras de cortes de 3



Figura 1. Aplicación de Crosslinking al ojo izquierdo de dos conejos.

mm centrales de la córnea y fueron incluidas en epon (resina epoxi), para luego realizarse cortes finos hasta llegar a 100 μm de profundidad y así obtener cortes ultrafinos de 50-70 nm de grosor, contrastadas con acetato de Uranyl y citrato y posteriormente evaluadas morfométricamente con microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, Modelo JEM-1200 EXII, hecho en Japón (perteneciente al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México).^{3,5,6} Medición de las fibras de colágeno con el programa Digital Micrograph (*Figuras 2 y 3*).

Resultados

Con la finalidad de identificar si existen cambios histológicos en las fibras de colágeno corneal tras la aplicación de "crosslinking" a la semana y a los tres meses, postratamiento se utilizaron 12 ojos de ocho conejos, divididos en dos grupos.

Se utilizó el método estadístico Z, para comparación de medias para grupos independientes, donde n es > 30 .

El primer grupo se integró con cuatro conejos, a los que se les trató con crosslinking al ojo izquierdo. A éstos se les sacrificó a la semana postratamiento, realizando 50 mediciones del grosor de las fibras de colágeno a cada ojo.

El segundo grupo se integró con cuatro conejos, a los que se les trató con crosslinking al ojo izquierdo. A éstos

se les sacrificó a los tres meses postratamiento, realizando 50 mediciones del grosor de las fibras de colágeno a cada ojo.

Como grupo control se tomaron los ojos derechos de dos conejos del primer grupo y los ojos derechos de dos conejos del segundo grupo, por razones de costos y de igualar los grupos a cuatro ojos cada uno, se realizaron 50 mediciones del grosor de las fibras de colágeno a cada ojo.

Para fines de comparación se utilizaron 50 mediciones del grosor de las fibras de colágeno de cada ojo izquierdo, total 200 mediciones, igual número de mediciones de los ojos derechos del grupo control.

Los ojos derechos (grupo control) presentaron una media de 42.01, 43.02, 41.02 y 39.03, respectivamente (*Figura 4*).

En los cuatro ojos izquierdos de los conejos sacrificados a la semana, las medias aritméticas fueron 43.56, 42.55, 43.60, y 40.57 nm, respectivamente (*Figura 5*).

En el grupo de conejos sacrificados a los tres meses, en los cuatro ojos izquierdos presentaron medias aritméticas de 42.08, 43.18, 42.07, y 41.15 nm (*Figura 6*).

Con la finalidad de realizar el análisis comparativo se procedió a calcular la media aritmética de las 200 medi-

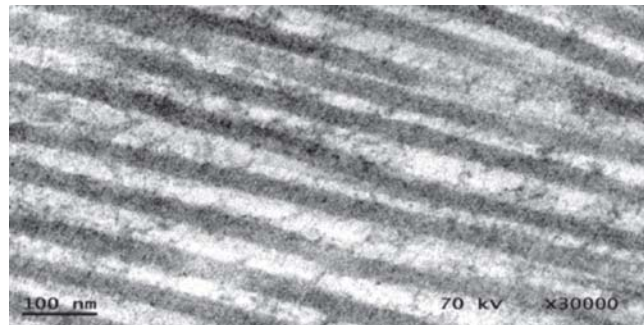


Figura 2. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de fibras de colágeno. Fuente: Directa.

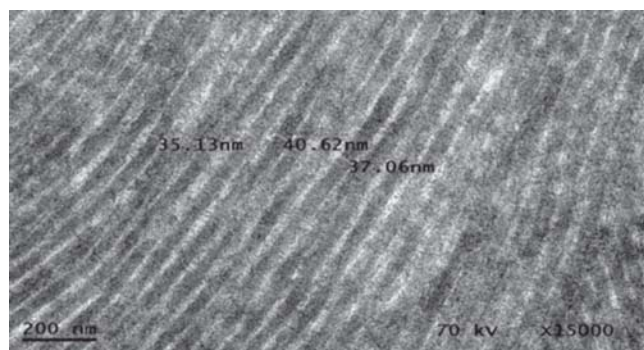


Figura 3. Medición de las fibras de colágeno mediante el programa Digital Micrograph. Fuente: Directa.

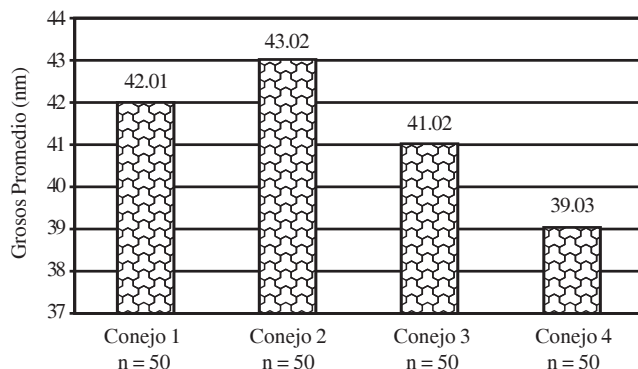


Figura 4. Grosor promedio de las fibras de colágeno de los ojos derechos no tratados (Grupo Control) de conejos.

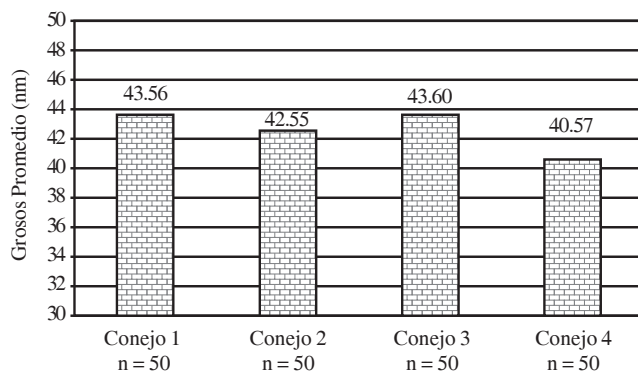


Figura 5. Grosor promedio de las fibras de colágeno del ojo izquierdo de conejos sacrificados a la semana después del tratamiento con Crosslinking.

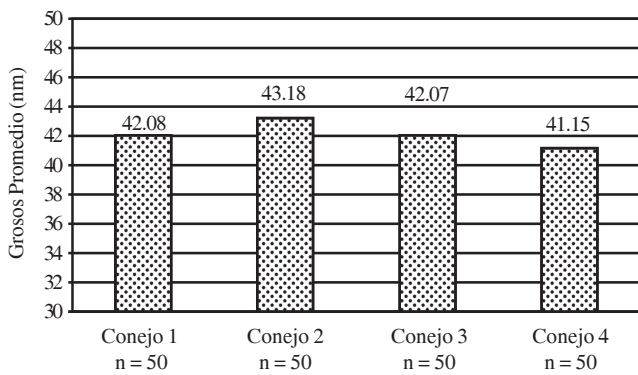


Figura 6. Grosor promedio de las fibras de colágeno del ojo izquierdo en conejos sacrificados a las 12 semanas.

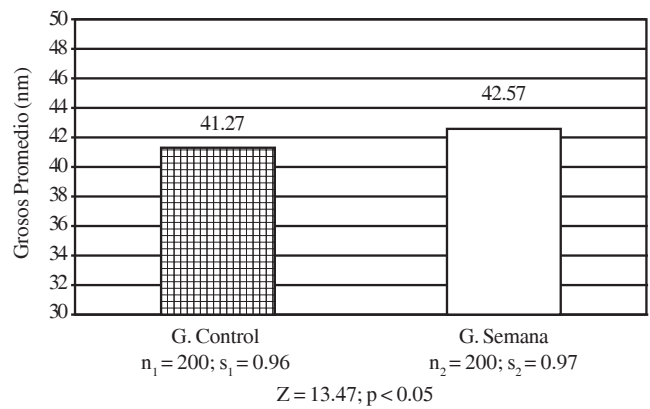


Figura 7. Análisis comparativo del grosor promedio de las fibras de colágeno del grupo de estudio de conejos sacrificados a la semana y el Grupo Control. Fuente: Cuadro 4.

ciones del grosor de las fibras de los cuatro ojos izquierdos de los conejos sacrificados a la semana.

Asimismo, se calculó la media aritmética de las 200 mediciones de los ojos derechos del grupo control.

Posteriormente se utilizó el método estadístico para comparación de medias cuando $n > 30$, denominado Método Z.

Encontrando que en el grupo sacrificado a la semana de tratamiento, el promedio del grosor de los ojos izquierdos y de los derechos, presentó una diferencia estadísticamente significativa a 95% de confianza en donde las medias son muy diferentes ($Z = 13.47; p > 0.05$) como se muestra en el *cuadro 1* y la *figura 7*.

Por otro lado, se realizó el análisis comparativo las medias aritméticas de las 200 mediciones del grosor de las

fibras de los cuatro ojos izquierdos de los conejos, pero en este caso de los conejos sacrificados a los tres meses, contra la media aritmética de 200 mediciones del grosor de las fibras de colágeno de los ojos derechos (control).

Se observó que en el grupo sacrificado a los tres meses de tratamiento, el promedio del grosor de los ojos izquierdos y de los derechos, sí presentó una diferencia estadísticamente significativa a 95% de confianza, en donde las medias son diferentes ($Z = 13.455; p < 0.05$) como se muestra en el *cuadro 2* y la *figura 8*.

Finalmente, se procedió al análisis comparativo, de los ojos izquierdos (tratados) tanto del grupo de conejos sacrificados a la semana como a las 12 semanas.

Cuadro 1. Análisis comparativo de las medias del grosor de las fibras de colágeno.

No.	Ojo Derecho				Ojo Izquierdo			
	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4
Media		41.27				42.57		
desvest		0.96				0.97		
N		200				200		
Análisis		$Z = 13.47; p < 0.05$						

Análisis comparativo de las medias del grosor de las fibras de colágeno de ojos izquierdos (Grupo de Estudio) tratados con Croslinking, de cuatro conejos sacrificados a la semana de tratamiento y cuatro ojos derechos (Control). Fuente: Directa.

Cuadro 2. Análisis comparativo de las medias del grosor de las fibras de colágeno.

No.	Ojo Derecho				Ojo Izquierdo			
	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4
Media		41.27						42.12
desvest		0.96						1.31
N		200						200
Análisis		$Z = 7.402; p < 0.05$						

Análisis comparativo de las medias del grosor de las fibras de colágeno de ojos izquierdos (Grupo de Estudio) tratados con Croslinking, de cuatro conejos sacrificados a las 12 semanas del tratamiento y cuatro ojos derechos (Control). Fuente: Directa.

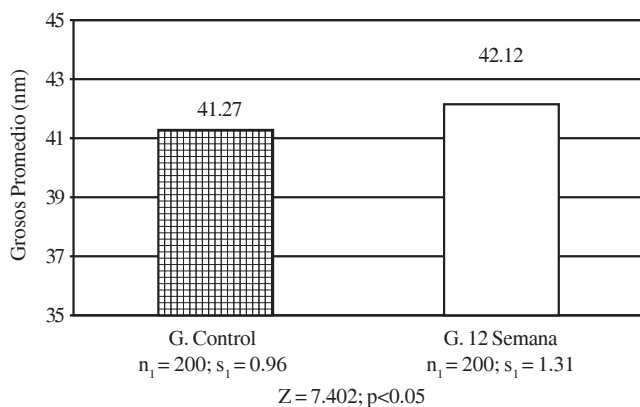


Figura 8. Análisis comparativo del grosor promedio de las fibras de colágeno del grupo de estudio de conejos sacrificados a los tres meses y el Grupo Control. Fuente: Cuadro 2.

Cuadro 3. Análisis comparativo de las medias del grosor de las fibras de colágeno.

Grupo	1 Semana	12 Semanas
Media	42.57	42.12
Desvest	0.97	1.31
N	200	200
Análisis	Z = 3.9; p < 0.05	

Análisis comparativo de las medias del grosor de las fibras de colágeno de ojos izquierdos (Grupos de Estudio) tratados con crosslinking de los conejos sacrificados a una semana y las 12 semanas de tratamiento. Fuente: Directa.

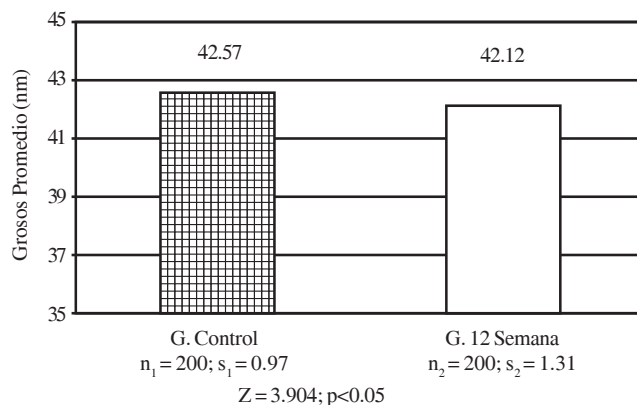


Figura 9. Análisis compartivo del grosor promedio de las fibras de colágeno en los Grupos de Estudio de conejos sacrificados a la semana y a los tres meses.

camente significativo en el grosor de las fibras de colágeno de los dos grupos de estudio en relación con el grupo control y, asimismo, una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al grosor de las fibras de colágeno entre el grupo de estudio de los conejos sacrificados a la semana del cual fue mayor el grosor en relación con el grupo sacrificado a los tres meses.

En nuestro estudio el aumento del grosor en el grupo de la semana fue de 3.1% (1.6 nm). Y disminuyó en el de las 12 semanas al 2% (0.85 nm).

Gregor Wollensak y cols., en el 2004, encontraron un incremento en el diámetro de fibras de colágeno en el estroma anterior de 12.2% (3.96 nm).⁴

Daxer y cols., 1998: Reportaron radio promedio de 65.2 ± 0.8 nm (< 65 años) y de 66.4 ± 0.7 nm (> 65 años), medidas por medio de dispersión de rayos x de ángulo pequeño y gran ángulo.⁷

En nuestro estudio y en otros donde se ha aplicado Crosslinking no se ha observado pérdida de la transparencia corneal.

En el presente estudio se evidencia la disminución estadísticamente significativa del grosor de las fibras de colágeno durante el tiempo de nuestro estudio, sin poderse asegurar en la presente investigación que esta disminución del grosor de las fibras de colágeno sea progresiva o se mantenga sin cambios al paso de más tiempo.

Es probable que en nuestro estudio el mayor grosor a la semana se deba a varios factores, entre ellos el proceso inflamatorio o incluso a la disminución transitoria de proteínas tales como el lumicano.

Tanto la inflamación como la síntesis de lumicano son afectados por el tiempo, disminuyendo y aumentando, respectivamente.

Conclusión

Existe un aumento en el grosor de las fibras de colágeno tras la aplicación de Crosslinking. En cuanto a las recomendaciones, los resultados obtenidos nos sugieren continuar con las investigaciones experimentales y clínicas acerca de este procedimiento de Crosslinking para el tratamiento de las ectasias corneales, para poder establecer el tiempo en que éste deba repetirse o en un momento dado no aplicarse.

Referencias

1. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 1780-5.
2. Daxer A, et al. Collagen fibrils in the human corneal stroma: Structure and aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 644-8.
3. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Current Opinion in Ophthalmology* 2006; 17: 356-60.
4. Wollensak G, Lomdina E. Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement, Available online 27 February 2009.

Encontrando una diferencia estadísticamente significativa entre las medias, en donde la media del grosor en los conejos sacrificados a la semana es significativamente mayor a 95 % de confianza. Como se muestra en el *cuadro 3* y la *figura 9*.

Discusión

El presente estudio ha mostrado un aumento estadísti-

5. Rostron C. Collagen Cross-linking with Riboflavin in a Hypotonic Solution, with UV light, on Corneas Less Than 400 microns thick: an exploratory study, Hypotonic riboflavin cross-linking protocol 2008; Version 1.3.
6. Agrawal VB. Corneal collagen cross-linking with ribob avin and ultraviolet-A light for keratoconus. Indian J Ophthalmol 2009; 57: 111-14.
7. Arbelaez MC, et al. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro, Oman. J Ophthalmol 2009; 2(1): 33-8.

