NATALIA TORRES GIACOMIN

**Análise da eficácia e segurança do *crosslinking* corneano em
pacientes com ceratocone avançado**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Marcony Rodrigues de
Santhiago

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Giacomin, Natalia Torres
Análise da eficácia e segurança do crosslinking
corneano em pacientes com ceratocone avançado /
Natalia Torres Giacomin. -- São Paulo, 2017.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oftalmologia.
Orientador: Marcony Rodrigues de Santhiago.

Descritores: 1.Ceratocone 2.Crosslinking
corneano 3.Córnea 4.Eficácia 5.Segurança
6.Terapêutica

USP/FM/DBD-508/17

Dedicatória

Aos meus pais **Izabel e Paulo**, que admiro profundamente, pelo amor, apoio incondicional, exemplo de humildade e dedicação, por acreditarem nos meus sonhos e por não medirem esforços para ajudar a realiza-los.

Ao meu noivo **Walter Pitman**, minha alma gêmea, meu grande amor, por ser mais do que eu poderia imaginar, por nunca duvidar das minhas conquistas, por sua firmeza de caráter, humildade, riqueza de conhecimentos, por me incentivar sempre na busca da realização pessoal e profissional. Por me inspirar a viver e por tornar-me a cada dia uma pessoa melhor. Pela felicidade que tanto busquei. Nada teria sentido sem você.

A minha avó **Esmerinda Torres Araujo** (in memoriam), por ser a base de tudo que sou, por ser até hoje meu conforto de todas as horas.

Aos meus irmãos, **Ana Paula, Paulo Júnior e Lorena**, por serem os melhores irmãos deste mundo, por tudo que vivemos e compartilhamos, por sermos juntos o alicerce da nossa família.

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcony Rodrigues de Santhiago**. Tive a honra de estar ao lado de um dos maiores pesquisadores da Oftalmologia deste país. Exemplo de determinação, agradeço por acreditar em mim e nos meus sonhos, por abrir as portas da ciência, por cada ensinamento sobre cada detalhe deste trabalho e de outros tantos que tive a oportunidade de realizar ao seu lado. Serei eternamente grata.

Ao **Dr. Marcelo Vieira Netto**, a maior referência em crosslinking do Brasil, por tudo que me ensinou, pelo exemplo de profissional, pelos conselhos de vida, pela oportunidade de desenvolver os seus estudos, pela humildade e por todas as oportunidades.

Ao **Prof. Dr. Mario Luiz Ribeiro Monteiro**, coordenador da Pós-Graduação na área de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, por ter me acolhido como aluna no programa de pós-graduação e pelo exemplo de competência e dedicação.

Ao **Dr. Sérgio Felberg, Dr. Paulo Dantas, Dra. Maria Cristina Nishiwaki-Dantas, Dr. Ricardo Holzchuh, Dr. Renato Giovedi, Dra. Marizilda Andrade, Dra. Elizabeth Guimarães** por me acolherem na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e contribuírem de forma determinante na minha formação.

Ao **Dr. Luiz Vieira e Dr Milton Seiyu Yogi**, em nome de todos meus professores durante os anos de residência médica.

Ao **Dr. José Geraldo Rigotti de Faria**, pelos primeiros ensinamentos sobre pesquisa científica, ainda durante a graduação em Medicina.

Aos companheiros da pós graduação **Carla Santos Medeiros, Gustavo Kupper Marino, Thais Callou, Cristiane Serpe e Cláudio Trindade** pela cumplicidade, amizade e apoio em todos os momentos.

À **Regina Ferreira de Almeida**, por não medir esforços na organização de cada passo desta tese, por fazer muito além do seu trabalho. A Pós-graduação do Departamento de Oftalmologia da Universidade São Paulo é fruto da sua dedicação, também.

Epígrafe

"O destino não é frequentemente inevitável, mas uma questão de escolha.
Quem faz escolha, escreve sua própria história, constrói seus próprios
caminhos."

(Augusto Cury)

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado *de* International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com List of Journals Index ed in Index Medicus.

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
<i>Abstract</i>	
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
3.1 Ceratocone.....	07
3.1.1 Propriedades biomecânicas da córnea com ceratocone.....	07
3.1.2 Classificação dos estágios do ceratocone.....	08
3.1.3 Indicações do Crosslinking no Ceratocone.....	09
3.2 Crosslinking de córnea.....	10
3.2.1 Conceitos Fundamentais em CXL.....	10
3.2.2 Riboflavina.....	11
3.2.3 Luz ultravioleta.....	11
3.2.4 Reação fotoquímica.....	12
3.2.5 Eficácia do CXL.....	13
3.2.6 Remodelamento corneano.....	13
3.2.7 Parâmetros de segurança e Complicações do CXL.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Avaliação pré e pós-operatória.....	18
4.2 Técnica cirúrgica de cxi (protocolo de dresden).....	19
4.3 Análise estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	22
5.1 Acuidade visual.....	24
5.2 Valores ceratométricos.....	25
5.3 Paquimetria.....	26
5.4 Contagem de células endoteliais.....	27
5.5 Segurança, Falha no tratamento e complicações.....	28
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO.....	35

8.	ANEXOS.....	37
9.	REFERÊNCIAS.....	45

AVCC	acuidade visual com correção
AVSC	acuidade visual sem correção
CXL	crosslinking do colágeno
D	dioptria
J	Joule
K	ceratometria
K₁	ceratometria mais plana
K₂	ceratometria mais curva
K médio	$K_1 + K_2 / 2$
K apical	maior valor ceratométrico medido pelo topógrafo
mW/cm²	milliwatts por centímetro quadrado
P	significância estatística
UV-A	radiação ultravioleta A
%	porcentagem
>	maior
<	menor
×	vezes (multiplicação)
µm	micra (micrômetro)

Tabela 1	Dados pré-operatórios dos pacientes do estudo.....	23
Tabela2	Valores ceratométricos, Acuidade visual e Paquimetria medidos no pré-operatório, 12, 24 e 48 meses após a cirurgia de crosslinking em olhos com ceratocone avançado.....	27

Figura 1	Comportamento da acuidade visual sem correção ao longo do seguimento.....	24
Figura 2	Comportamento da acuidade visual com correção ao longo do seguimento.....	25
Figura 3	Média e desvio padrão dos valores ceratométricos no pré-operatório e ao longo do seguimento. A: valores de K1; B: valores de K2; C: valores de K médio ($K1 + K2 / 2$) e D: valores de K apical.....	26
Figura 4	Comportamento da contagem de células endoteliais ao longo do seguimento.....	28
Figura 5	Mudanças da Acuidade Visual com correção (linhas de Snellen) após 48 meses de seguimento.....	30

Giacomin NT. Análise da eficácia e segurança do crosslinking corneano em pacientes com ceratocone avançado [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017

OBJETIVOS: Analisar a segurança e eficácia da cirurgia de crosslinking (CXL) de córnea em pacientes com ceratocone em estágios avançados após um seguimento de 4 anos. **MÉTODOS:** Trata-se de um estudo retrospectivo de pacientes com ceratocone avançado em progressão (Estágio 3 e 4 da classificação de Amsler-Krumeich) que foram submetidos a cirurgia de CXL seguindo o protocolo padrão. Os parâmetros examinados foram acuidade visual com (AVCC) e sem (AVSC) correção, valores ceratométricos (média, plana, curva e apical), paquimetria, e contagem de células endoteliais no pré-operatório e após 12, 24 e 48 meses do procedimento. **RESULTADOS:** Este estudo abrange quarenta olhos de 40 pacientes que foram submetidos a cirurgia de CXL. A média de idade foi 22,5 anos (Intervalo:15 a 37 anos). Tanto a AVSC quanto a AVCC permaneceram estáveis durante o período de seguimento, sem mudanças estatisticamente significativas. Apesar de todos os valores ceratométricos sofrerem uma leve diminuição, apenas a ceratometria apical atingiu uma mudança com significado estatístico ($P=0,037$) após 4 anos de seguimento. Uma redução significativa da espessura corneana foi também observada (paquimetria ultrassônica era de 388 ± 49 e passou para 379 ± 48 μm , $P<0,0001$; paquimetria através de tomografia de imagem em fenda era de 362 ± 48 e foi para 353 ± 51 μm , $P<0,0001$); embora essa diferença não seja clinicamente significativa. A contagem de células endoteliais não sofreu alterações significativas durante o seguimento. A taxa de falha do tratamento

foi de 5% (dois pacientes) durante o seguimento. **CONCLUSÃO:** A cirurgia de CXL corneano em pacientes com ceratocone avançado se mostrou segura e capaz de manter os parâmetros visuais e topográficos pelo menos durante 4 anos.

Descritores: ceratocone; crosslinking corneano; córnea; eficácia; segurança; terapêutica

Abstract

Giacomin NT. Safety and efficacy analysis of corneal collagen crosslinking in advanced keratoconus [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

PURPOSE: To analyze the safety and efficacy of standard corneal collagen crosslinking (CXL) in advanced cases of progressive keratoconus (KC) after four years of follow-up. **METHODS:** A retrospective case series of patients with advanced progressive KC (stage 3 and 4 of Amsler-Krumeich classification) underwent standard CXL treatment. The parameters examined were changes in uncorrected visual acuity (UDVA), corrected visual acuity (CDVA), keratometry values (mean K, flattest K, steepest K, and apical K), pachymetry, and endothelial cell count at the baseline and at 12-, 24- and 48-months postoperatively. **RESULTS:** Forty eyes of 40 patients were enrolled into the study. The mean patient age was 22.5 years (range: 15 to 37 years). Both mean UCVA and CDVA remained stable during the time points; no statistically significant change was noted. Although a slightly reduction was observed in all keratometric readings, a statistically significant reduction was only reached in the apical K ($p=0.037$) at four years after CXL. A significant reduction in the pachymetry was also found (from 388 ± 49 to 379 ± 48 μm , $P<0,0001$ and from 362 ± 48 to 353 ± 51 μm , $P<0,0001$, ultrasonic and slit-scanning readings, respectively) ; however this change is not likely clinically meaningful. Endothelial cell count was not significantly modified at the end of the study. Treatment failure or progression was noted in two patients (5%) over the follow-up period. **CONCLUSION:** Standard CXL treatment seems to be safe and able to stabilize both visual acuity and topographic parameters at four-year follow-up

in advanced keratoconic eyes

Descriptors: keratoconus; corneal collagen crosslinking ; cornea; efficacy; safety; therapeutics

1. Introdução

O ceratocone é uma doença ectásica da córnea, de caráter progressivo, bilateral, não inflamatória, caracterizada por afinamento e encurvamento corneano, e que se inicia em geral na segunda década de vida.^{1,2} O colágeno do tipo 1 é o principal elemento de ligação do estroma corneano, organizado em lamelas que se integram à matriz extracelular, conferindo tanto rigidez quanto transparência. Alterações intrínsecas desta matriz lamelar durante o alinhamento do colágeno levam à instabilidade biomecânica, cursando com deterioração da elasticidade e rigidez corneana além de subsequente encurvamento do tecido, o que clinicamente resulta em piora da acuidade visual devido ao astigmatismo irregular, miopia progressiva, aberrações de maior ordem, cicatrizes e opacidades associadas a hidrópsia.¹

A perda da estabilidade biomecânica se correlaciona diretamente com o encurvamento progressivo da córnea tanto em pacientes com ceratocone quanto nos casos de ectasia pós cirurgia refrativa.^{1,3} A técnica que se convencionou chamar de crosslinking do colágeno (CXL) tem se mostrado capaz estagnar ou ao menos retardar a progressão da doença ectásica.^{4,5} A teórica ação do CXL ocorre pela interação fotoquímica da riboflavina com um determinado comprimento de onda de radiação ultravioleta A (UV-A). Esta reação produz ligações covalentes adicionais entre cadeias colaterais de colágeno e proteoglicanos da matriz extracelular, o que gera aumento da força tensional da córnea e eventual remodelamento deste tecido.^{4,9}

Introduzido por Spoerl e Seiler em 1998⁵; o protocolo tradicional consiste em aplicar radiação UV-A (370 nm) sobre a córnea por 30 minutos, através de uma fonte de luz emissora, na frequência de 3 mW/cm². Neste

período, a riboflavina é instilada a cada 5 minutos, resultando em um total de energia de $5,4 \text{ J/cm}^2$, já que 1 J corresponde a 1 watt $\times$ segundo. A interação entre riboflavina e a radiação ultravioleta UV-A, produz espécies reativas de oxigênio de forma a induzir novas ligações covalentes entre as cadeias colaterais das fibras de colágeno adjacentes na lamela estromal e entre estas e proteoglicanos da matriz extracelular, aumentando significativamente o componente intrínseco de resistência da córnea.¹⁰

O ceratocone avançado é definido nesta tese como estágios 3 e 4 da classificação de Amsler-Krumeich, em que o estágio três são pacientes com ceratometria média central acima de 53 dioptrias ou espessura mínima da córnea entre 300 e 400 μm e estágio 4 aqueles com ceratometria média central maior que 55 dioptrias.¹¹

Segundo Koller et al¹² há um maior risco de falha do CXL no tratamento de pacientes com ceratocone que apresentam ceratometria máxima acima de 58 dioptrias(D), porém não existem ainda estudos que avaliem diretamente a eficácia e segurança desta cirurgia especificamente em casos avançados e que eventualmente corroborem esta taxa de falha. Embora implantes de segmento de anel alterem a curvatura da córnea, o CXL é o único método capaz de impedir a progressão da doença. Nossa hipótese é que em casos avançados, ainda com acuidade visual satisfatória através da adaptação de lentes rígidas gás permeáveis ou lentes esclerais, evitar a progressão da doença representaria uma alternativa realista ao transplante de córnea.

2. Objetivos

Considerando-se o exposto acima e a necessidade de evidência em torno da eficácia deste procedimento em uma determinada parcela da população, nos propomos os seguintes objetivos:

1. Avaliar a eficácia do CXL em pacientes com ceratocone avançado;
2. Avaliar a segurança do CXL em pacientes com ceratocone avançado;
3. Descrever as complicações do CXL em pacientes com ceratocone avançado;
4. Investigar correlações entre variáveis intra-operatórias e eventuais falhas do tratamento

3. Revisão de Literatura

3.1 Ceratocone

O ceratocone é uma doença progressiva caracterizada por encurvamento, em geral assimétrico, afinamento localizado e astigmatismo irregular associados a deterioração da função visual e da qualidade da imagem. Pode afetar ambos os sexos e todas as etnias, apesar de ter sido mostrado alta incidência em asiáticos quando comparado aos caucasianos. O início da doença normalmente ocorre durante a puberdade e progride até a quarta década. É considerado uma doença bilateral e na maioria dos casos os olhos são afetados de forma assimétrica.^{1,11,13}

3.1.1 Propriedades biomecânicas da córnea com ceratocone

As córneas com ceratocone apresentam uma alteração na orientação ortogonal das lamelas de colágeno e apenas os 200 µm anteriores parecem estar comprometidos.^{14,15} Há uma distribuição desigual do colágeno no estroma da córnea e deslizamento das fibras de colágeno intra- e interlamelares principalmente ao redor do ápice do cone, o que provoca uma redução do módulo elástico e rigidez corneana. Tal desorganização da rede de colágeno associado à pressão intra-ocular faz com que a córnea enfraquecida se torne progressivamente mais curva.^{16,17}

O afinamento corneano observado em pacientes com ceratocone está associado ao comprometimento da matriz extracelular pelo aumento da atividade de enzimas proteolíticas, incluindo metaloproteinases e diminuição

dos níveis dos seus inibidores.¹⁸

Pacientes com ceratocone apresentam uma redução significativa da rigidez corneana, que ocorre basicamente devido a 3 fatores: afinamento localizado, redução do módulo elástico em determinado meridiano; e redução do módulo de rigidez ou cisalhamento perpendicular à superfície corneana.^{19, 20}

3.1.2 Classificação dos estágios do ceratocone

Existem várias formas de classificação do ceratocone, algumas delas incluem apenas uma variável, como a ceratometria, morfologia ou paquimetria. As mais aceitas no mundo são aquelas que incluem mais de uma variável, como a classificação de Amsler-Krumeich ou Alio-Shabayek. Abaixo segue a classificação de Amsler-Krumeich utilizada para classificar os pacientes deste estudo.¹¹

Grau I

- Encurvamento excêntrico da córnea
- Miopia e/ou astigmatismo < 5 D
- K médio central $\leq$ 48 D

Grau II

- Ausência de cicatriz corneana
- Miopia e/ou astigmatismo entre 5 e 8 D
- K médio central > 48 D e $\leq$ 53 D
- Espessura central mínima > 400 μ m

Grau III

- Ausência de cicatriz corneana
- Miopia e/ou astigmatismo entre 8 e 10 D
- K médio central > 53 D e ≤ 55 D
- Espessura central mínima entre 300 e 400 μm

Grau IV

- cicatriz corneano central
- refração não confiável
- K médio central > 55 D
- Espessura central mínima < 300 μm

3.1.3 Indicações do CXL no Ceratocone

A cirurgia de CXL representa um marco na abordagem terapêutica dos pacientes com ectasia corneana, já que sua ação é direcionada exatamente ao que causa a instabilidade do estroma da córnea, ao invés de apenas melhorar as consequências refrativas da doença.²¹

Muitos resultados encorajadores já foram relatados de forma extensiva na literatura, não só no tratamento do ceratocone mas também na abordagem da degeneração marginal pelúcida e ectasia pós cirurgia refrativa.^{8,22}

A cirurgia de CXL é indicada em pacientes com progressão documentada do ceratocone na idade adulta. Já nos casos de ceratocone em crianças e ectasia pós-cirurgia refrativa a indicação pode ser feita no momento do diagnóstico.^{7,23,24}

A maioria dos estudos relatam resultados do CXL em pacientes com estágio inicial da doença, já os resultados relacionados a cirurgia em pacientes com ceratocone em estágio avançado ainda são muito escassos,

particularmente aqueles em estágio III e IV da classificação de Amsler-Krumeich.

3.2 Crosslinking de Córnea

A teoria de que a indução de ligações covalentes de colágeno por CXL no tecido corneano poderia resultar em enrijecimento e fortalecimento de córneas ectásicas foi responsável pelo surgimento do CXL corneano no final dos anos 1990.⁴

Além disso, estudos observacionais que demonstravam menor incidência de ceratocone em pacientes diabéticos revelaram que ocorria uma reação natural de CXL nesses pacientes, oriunda da glicosilação proteica não enzimática. Em outras áreas, como na odontologia, a luz ultravioleta é utilizada para o endurecimento de resinas e serviu de inspiração para o advento do CXL corneano.²⁵

3.2.1 Conceitos Fundamentais em CXL

Os requisitos fundamentais para a realização do CXL corneano são: um fotoindutor, uma fonte luminosa com intensidade adequada e parâmetros seguros, e uma reação fotoquímica capaz de induzir a formação de radicais livres pela criação de ligações químicas entre fibrilas de colágeno.⁵

3.2.2 Riboflavina

A riboflavina (vitamina B₂) é o fotoindutor utilizado no CXL corneano por ser uma substância fotossensível e se degradar rapidamente na presença de luz, podendo assim, ser uma fonte fotossensibilizadora, capaz de originar radicais livres na presença de luz e oxigênio molecular. Quando exposto a radiação UV-A suas moléculas absorvem energia e alcançam um estado excitado; neste estado podem produzir radicais livres que são capazes de induzir ligações covalentes entre as fibras de colágeno ou outras moléculas corneanas como proteoglicanos e ácidos nucleicos. Estes radicais são capazes de danificar o DNA ao produzirem derivados oxidados de suas bases e inativar algumas enzimas. Durante o procedimento de CXL corneano, a riboflavina também age como um importante filtro à penetração da radiação UV-A intraocular.^{26,28}

3.2.3 Luz ultravioleta

A luz ultravioleta é igualmente importante para a realização do CXL corneano. A sua segurança para utilização em córneas humanas depende do seu comprimento de onda e do seu nível e tempo de irradiação.²⁹ Baseado na lei da reciprocidade de Bunsen-Roscoe, em que um efeito bioquímico é semelhante desde que mantida constante a quantidade total de energia, variações desses parâmetros de tempo e intensidade de irradiação podem ser utilizadas, com inúmeros estudos comparando segurança, eficácia e tempo de

duração de seu efeito com o protocolo original de Dresden.^{30,31}

De acordo com o protocolo de Dresden, a eficácia máxima quanto ao enrijecimento corneano se dá utilizando a energia de 3mW/cm^2 por 30 minutos, o que corresponde a uma dose total de energia de $5,4\text{J/cm}^2$.⁵

3.2.4 Reação fotoquímica

A riboflavina fotossensibilizada pode evoluir para 2 tipos de reações: aeróbica do tipo 2 e, menos frequentemente, anaeróbica do tipo 1, ambas com a capacidade de originar espécies reativas de oxigênio indutoras de ligações covalentes entre moléculas de colágeno e entre estas e proteoglicanos.⁹

O oxigênio livre está envolvido com o efeito citotóxico da terapia fotodinâmica e com a ativação da expressão gênica. A extensão deste efeito pode ser clinicamente visualizado como uma linha demarcatória na córnea inicialmente com a lâmpada de fenda, e confirmada posteriormente por microscopia confocal e tomografia de coerência óptica.^{32,33}

O oxigênio possui papel fundamental na atividade de CXL. Tratamentos realizados em baixas taxas de oxigênio ambiental demonstraram falha no processo de estabilidade biomecânica da córnea, mostrando-se essencial ao procedimento de CXL.³⁴

3.2.5 Eficácia do CXL

O primeiro estudo clínico que incluiu pacientes com ceratocone em progressão submetidos ao protocolo padrão (Dresden) foi publicado em 2003 por Wollensak.⁵ E os primeiros ensaios clínicos controlados e randomizados confirmaram a eficácia na interrupção da progressão da doença de forma segura, incluindo ainda aplanamento, melhora da acuidade visual, afinamento transitório da córnea durante os seis primeiros meses e melhora dos parâmetros topográficos.^{7,8,23} Raiskup et al⁸ publicaram o estudo com o seguimento mais longo até a presente data, dez anos de acompanhamento de pacientes com ceratocone, confirmando estabilidade, melhora da acuidade visual e dos parâmetros topográficos a longo prazo.

3.2.6 Remodelamento Corneano

Embora o curso clínico típico após o tratamento com o CXL seja de modo geral previsível, existe uma variação significativa de paciente para paciente, e o remodelamento específico de tecidos de várias camadas da córnea, especialmente do epitélio, permanece ainda pouco compreendido.³⁵ Estudos prévios mostraram que olhos com ceratocone apresentam espessura epitelial mais fina que o normal sobre o ápice da córnea enquanto a espessura epitelial nas áreas adjacentes ao ápice é mais grossa que o normal. Após o CXL, olhos com ceratocone apresentaram diminuição das espessuras epiteliais mínima e máxima antes e após o tratamento, que resultou em regularização

epitelial.^{35,36}

O intenso remodelamento epitelial no período inicial que se segue ao CXL promove uma redução da espessura epitelial periférica e uma variação regional da espessura epitelial.³⁷ Esse processo pode ser responsável em parte pela diminuição transitória da acuidade visual, uma vez que ocorre perda dos padrões compensatórios fisiológicos de espessamento e afinamento epitelial, que tem o intuito de minimizar eventuais irregularidades topográficas locais e restabelecer, na medida do possível, a curvatura corneana normal. Este mesmo remodelamento epitelial pode, no entanto, resultar em uma superfície corneana mais regular e homogênea, que explicaria a melhora da acuidade visual durante os meses que se seguem ao tratamento.³⁸

O remodelamento e o enrijecimento associados ao processo cicatricial podem levar também ao aplanamento, muitas vezes significativo, afinamento ou mesmo opacidade corneana. Muitos estudos já demonstraram que pode acontecer intenso aplanamento após o CXL, podendo ultrapassar 10D.^{39,40} Os principais motivos relacionados ao aplanamento intenso são provavelmente o aumento localizado do módulo elástico do tecido, a profundidade efetiva do tratamento e a localização central do cone.^{39,41}

3.2.7 Parâmetros de Segurança e Complicações do CXL

Os parâmetros de segurança estão centrados na proteção de estruturas oculares, tais como endotélio da córnea, cristalino e retina. Primeiramente, uma espessura da córnea acima de 400µm deve ser respeitada afim de proteger o

endotélio. Uma vez removido o epitélio, existe o risco de desidratação, causando afinamento significativo em alguns casos, já que muitos pacientes com ectasia de córnea já possuem afinamento corneano antes do tratamento.

42

Protocolos modificados utilizam a riboflavina hipo-osmolar, que promove retenção de líquido, levando a aumento da espessura em até aproximadamente 25% do valor original, chegando muitas vezes até a espessura mínima recomendada para o tratamento.⁴³ As córneas artificialmente hidratadas podem limitar a eficácia do CXL devido ao aumento da distância das fibras de colágeno.⁴⁴

A remoção do epitélio cria uma variedade de riscos, tais como ceratite infecciosa, *haze*, infiltrados estéreis e reepitelização tardia. O dano aos ceratócitos prejudica a cicatrização, embora ocorra um repovoamento algumas semanas após o procedimento.⁴⁵

4. Materiais e Métodos

Este é um estudo retrospectivo de 40 olhos de 40 pacientes que foram submetidos a cirurgia de CXL de córnea com protocolo de Dresden⁵ entre 2008 e 2010. Para participarem deste estudo os pacientes deveriam apresentar ceratocone avançado e completar pelo menos 4 anos de seguimento após o procedimento.

As cirurgias foram realizadas no Instituto Oftalmológico Paulista, São Paulo, Brasil e todas as exigências éticas e legais foram seguidas de acordo com a declaração de Helsinki. O termo de consentimento informado foi entregue aos pacientes após orientação exhaustiva sobre o procedimento. Além disso, este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade de São Paulo e do Instituto Oftalmológico Paulista.

Os pacientes deveriam apresentar ceratocone em progressão para que fossem submetidos a cirurgia de CXL e apenas pacientes que completassem um seguimento mínimo de 48 meses poderiam ser incluídos neste estudo. Nos casos em que ambos os olhos preenchessem os critérios de inclusão, foi incluído o olho com doença mais avançada.

Os casos de ceratocone avançado eram determinados a partir da classificação de Amsler-Krumeich:

- Estágio 3: ceratometria média central maior que 53 dioptrias ou espessura corneana entre 300 e 400 μm
- Estágio 4: ceratometria média central maior que 55 dioptrias

A progressão do ceratocone foi determinada baseado na mudança refracional de pelo menos 1,0 dioptria (D) de astigmatismo ou miopia nos últimos 6 meses ou um aumento na ceratometria máxima de pelo menos 1,0D

em um ano. Os critérios de exclusão foram gravidez ou lactação, outras doenças corneanas ativas, cirurgia corneana prévia, doença ocular ou sistêmica que pudesse afetar a reepitelização e síndrome do olho seco.

4.1 Avaliação pré e pós-operatória

As avaliações foram feitas de forma completa pelo mesmo médico em todos os pacientes no pré-operatório, 12, 24 e 48 meses após a realização do CXL. Foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Acuidade visual sem correção (AVSC)
- Acuidade visual com correção (AVCC)
- Biomicroscopia
- Tonometria de aplanção
- Fundoscopia indireta

E ainda, alguns exames complementares foram realizados:

- Paquimetria ultrassônica (Corneogage Plus; Sonogage, Inc., Cleveland, OH)
- Paquimetria através de tomografia de imagem em fenda (Orbican; Bausch & Lomb, Rochester, NY)
- Ceratoscopia computadorizada baseada em discos de plácido (Atlas 9000; Carl Zeiss Meditec, Inc., Dublin, CA)

- Contagem de células endoteliais utilizando microscopia especular de não contato (Konan Medical, Inc., Hyogo, Japan)

Sendo que, na ceratoscopia computadorizada, foram medidas as ceratometrias dos 3 mm centrais, ceratometria silumada do eixo mais plano e mais curvo, ceratometria média e apical.

4.2 Técnica cirúrgica de CXL - protocolo de Dresden

Todos os pacientes foram submetidos a cirurgia de CXL seguindo o protocolo de Dresden.⁵ Após a assepsia e antissepsia é feita anestesia tópica, irrigação com solução salina balanceada e alocação do blefarostato. O epitélio corneano foi removido manualmente nos 9 mm centrais e a solução de Riboflavina 0,1% instilada a cada 2 minutos por 30 minutos até alcançar uma completa penetração da solução por toda a espessura corneana. A irradiação com luz ultravioleta é iniciada após a detecção da riboflavina na câmara anterior utilizando a lâmpada de fenda com filtro azul. A radiação ultravioleta é emitida por um aparelho (CSO, Florence, Italy) que emite a luz em um comprimento de onda de 370 nm e uma irradiância de 3mW/cm² ou 5,4J/cm². Durante os 30 minutos de exposição a riboflavina foi instilada a cada 5 minutos. O diâmetro da luz irradiada era de 7,5 mm e distava de 5 cm da córnea. Os casos em que a paquimetria central mostrava córneas finas com menos de 400 µm foram tratados previamente com solução hipotônica de riboflavina para aumentar a espessura da córnea até o limite de 400 µm.

Durante o pós-operatório os pacientes permaneceram uma lente de

contato terapêutica até a completa reepitelização da córnea. A prescrição continha gatifloxacina 4 vezes ao dia por 7 dias e prednisolona 1% três vezes ao dia por 20 dias, além de carboximetilcelulose 0,5% quando necessário.

No pós-operatório a estabilidade dos valores ceratométricos foi considerada quando não houve progressão de pelo menos 1,0D do K apical nas avaliações. O aplanamento significativo foi considerado quando o K apical diminuiu mais que 1,0D. A falha no tratamento foi considerada quando houve um aumento de mais de 1,0D do K apical durante qualquer período do seguimento pós-operatório. A segurança do procedimento foi avaliada através da perda de mais de uma linha de visão na tabela de Snellen observando a acuidade visual com correção no último seguimento.

4.3 Análise Estatística

A análise estatística foi feita através do software SPSS para Windows (versão 20.0; SPSS, Inc., Chicago, IL), e todos os dados coletados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. A normalidade dos dados analisados com o teste Kolmogorov–Smirnov. As comparações foram feitas utilizando-se de equações de estimativa generalizada, matriz correlação auto-regressiva de primeira ordem entre os momentos e distribuição da normal. As comparações múltiplas da mesma variável nos diferentes momentos do seguimento foram feitas com Anova. Para as variáveis numéricas de distribuição normal foi utilizado o teste t de *Student* e para as não normais foi empregado Wilcoxon. A acuidade visual foi medida através da tabela de Snellen, mas para análise

estatística os valores foram convertidos para logaritmo do ângulo mínimo de resolução (logMar) utilizando-se as tabelas padrões para conversão. O nível de significância estatística foi considerado quando o valor de P fosse menor que 0,001 após a correção de Bonferroni para ajuste de múltiplas comparações.

5. Resultados

Este estudo analisou 40 olhos de 40 pacientes, os quais 20 eram do sexo masculino e 20 do sexo feminino com uma média de idade de $22,5 \pm 5,3$ anos (intervalo: 15 a 37 anos). A tabela 1 mostra os dados pré-operatórios de forma mais clara. O tempo de reepitelização durou em média 7 ± 2 dias e após a cirurgia de CXL foi detectado uma demarcação linear no estroma da córnea ainda no primeiro mês.

Tabela 1- Dados pré-operatórios

Parâmetros	Valores
Pacientes (n)	40
Olhos (n)	40
Idade (anos)	
Média	22.5
Intervalo	15 - 37
Riboflavina padrão/hipo-osmolar (n)	18 / 22
Classificação do Ceratocone (n)	
Estágio III	16
Estágio IV	24
AVCC (LogMar)	
Média	0,66
Intervalo	0,4 – 1,3
Paquimetria (μm)	
Média	361,93
Intervalo	294 - 459
Seguimento (meses)	48

n: número de olhos; AVCC: acuidade visual com correção;

5.1 Acuidade Visual

A acuidade visual média sem correção (AVSC) na avaliação pré-operatória era de $1,17 \pm 0,32$ logMar (intervalo: 0,6 a 1,6) e permaneceu estável após 48 meses de seguimento, onde apresentou uma média de $1,17 \pm 0,31$; intervalo: 0,6 a 1,6). Nessa análise não houve diferença estatisticamente significativa ($P= 0,349$).

Já acuidade visual média com correção (AVCC) no período pré-operatório era de $0,66 \pm 0,21$ (intervalo: 0,4 a 0,6). Após 48 meses de seguimento não houve diferença estatística ($P=0,363$) e a média da AVCC era de $0,66 \pm 0,25$ (intervalo: 0,3 a 0,6). Ficando claro que tanto a AVSC quanto AVCC permaneceram estáveis após o CXL mesmo após 48 meses de seguimento.

Figura 1- Comportamento da acuidade visual sem correção ao longo do seguimento

Figura 2- Comportamento da acuidade visual com correção ao longo do seguimento

5.2 Valores Ceratométricos

As análises dos valores ceratométricos que a média dos valores de K_1 , K_2 , K médio e K apical permaneceram estáveis e sem diferença estatisticamente significativa durante os 48 meses após o tratamento. (Tabela 2 e Figura 3). Trinta e oito olhos (95%) apresentaram valores de K apical iguais ou menores, enquanto dois olhos (5%) apresentaram progressão da doença, com aumento dos valores de K apical de pelo menos 1 dioptria em algum momento do pós operatório. A idade dos pacientes que tiveram falha no tratamento era de 21 e 18 anos, ambos do sexo feminino, apresentavam paquimetria ultrassônica central de 455 e 307 μm , K apical 59,7 D e 67,5 D

respectivamente.

Entre aqueles olhos que permaneceram estáveis ou tiveram aplanamento corneano, 27 deles (67,5%) tiveram valor de K apical estável (com mudança entre 0 e 1,00 D), 9 olhos (22,5%) apresentaram aplanamento do K apical que variou entre 1,10 e 2,00 D, e 2 olhos (5%) apresentaram aplanamento superior a 2,10 D.

Figura 3- Média e desvio padrão dos valores ceratométricos no pré-operatório e ao longo do seguimento. A: valores de K_1 ; B: valores de K_2 ; C: valores de K médio ($K_1 + K_2 / 2$) e D: valores de K apical

5.3 Paquimetria

A média dos valores de espessura central da córnea medidas através da paquimetria ultrassônica diminuíram de $388,20 \pm 49,21$ para $379,25 \pm 48 \mu\text{m}$ (P

< 0,0001) no fim dos 48 meses de seguimento. Essa redução estatisticamente significativa também foi notada quando o ponto mais fino foi medido pela tomografia de imagem em fenda, que mudou de $361,93 \pm 47,95 \mu\text{m}$ no pré-operatório para $353,30 \pm 50,74 \mu\text{m}$ após 48 meses.

Tabela 2- Valores ceratométricos, Acuidade visual e Paquimetria medidos no pré-operatório, 12, 24 e 48 meses após a cirurgia de crosslinking em olhos com ceratocone avançado

Parâmetros	Média $\pm$ Desvio Padrão (Intervalo)				P
	Pré-operatório	12 meses	24 meses	48 meses	
K₁ (D)	53.11 $\pm$ 3.46 (47-58)	53.00 $\pm$ 3.48 (47-58)	52.89 $\pm$ 3.66 (47-59)	52.78 $\pm$ 3.75 (47-58)	0.177
K₂ (D)	59.51 $\pm$ 3.92 (50-67)	59.36 $\pm$ 4.05 (50-67)	59.32 $\pm$ 4.00 (50-67)	59.27 $\pm$ 4.09 (50-67)	0.168
K médio (D)	56.31 $\pm$ 3.57 (49-62)	56.18 $\pm$ 3.65 (50-63)	56.10 $\pm$ 3.69 (49-63)	56.03 $\pm$ 3.79 (49-63)	0.152
K apical (D)	64.45 $\pm$ 4.59 (56-73)	64.44 $\pm$ 4.72 (57-74)	64.19 $\pm$ 4.61 (56-72)	63.97 $\pm$ 4.92 (56-72)	0.041
AVSC (logMAR)	1.17 $\pm$ 0.32 (0.60-1.60)	1.14 $\pm$ 0.32 (0.60-1.60)	1.17 $\pm$ 0.32 (0.60-1.60)	1.17 $\pm$ 0.31 (0.60-1.60)	0.349
AVCC (logMAR)	0.66 $\pm$ 0.21 (0.40-1.30)	0.69 $\pm$ 0.24 (0.40-1.30)	0.66 $\pm$ 0.23 (0.40-1.30)	0.66 $\pm$ 0.25 (0.40-1.30)	0.363
Ponto mais fino (μm)	361.93 $\pm$ 47.95 (294-459)	354.10 $\pm$ 50.27 (249-443)	354.62 $\pm$ 48.77 (271-459)	353.30 $\pm$ 50.74* (254-459)	<0.0001
Paquimetria (μm)	388.20 $\pm$ 49.61 (317-488)	384.05 $\pm$ 49.58 (308-485)	384.78 $\pm$ 48.02 (301-481)	379.25 $\pm$ 48.00* (304-458)	<0.0001
ECD (cels/mm²)	3005.92 $\pm$ 394.98 (2008-3850)	2988.02 $\pm$ 244.20 (2414-3456)	3038.11 $\pm$ 340.80 (2297-3875)	3007.05 $\pm$ 358.01 (2238-3850)	0.935

* = Mudança estatisticamente comparada ao valores de pré-operatório.

K: ceratometria; D: dioptrias; K apical : ceratometria maxima medida pelo topógrafo; K médio = (K1 + K2)/2; AVSC: acuidade visual sem correção ; AVCC: acuidade visual com correção; ECD: contagem de células endoteliais

5.4 Contagem de células endoteliais

Não foram observados mudanças significativas na contagem de células endoteliais quando analisado comparativamente qualquer período do seguimento (Tabela 2 e Figura 4). O valor médio de contagem de células endoteliais no período pré-operatório era de $3005,92 \pm 394,98$ células/mm². Nas avaliações de 12, 24 e 48 meses após o tratamento a contagem de células endoteliais era de $2998,02 \pm 244,20$, $3038,11 \pm 340,80$ e $3007,05 \pm 358,01$ células/mm², respectivamente ($P = 0,935$).

Figura 4- Comportamento da contagem de células endoteliais ao longo do seguimento

5.5 Segurança, Falha no tratamento e Complicações

A segurança do tratamento foi avaliada através da perda de linhas de visão da acuidade visual corrigida ao final do seguimento. Dentre os quarenta olhos estudados, trinta e cinco (87,5%) permaneceram sem mudanças significativas ou até melhoraram a acuidade visual, enquanto 1 olho (2,5%) perdeu duas linhas de visão e 4 olhos perderam uma linha de visão (Figura 5). Dois pacientes (5%) continuaram apresentando progressão da doença já detectado aos 12 meses de seguimento em um deles e aos 24 meses de seguimento no outro.

Alguma complicações no pós-operatório foram observadas como por exemplo ceratite central estéril em um olho e *haze* moderado em quatro olhos nos primeiros meses de pós operatório, porém após 12 meses de seguimento, nenhum paciente apresentou *haze* clinicamente significativo.

Figura 5- Mudanças da Acuidade Visual com correção (linhas de Snellen) após 48 meses de seguimento

6. Discussão

De um modo geral, este estudo mostrou de forma clara e segura a eficácia do CXL convencional em pacientes com ceratocone em progressão nos estágios avançados, mesmo após 48 meses de seguimento.

Ao utilizar os altos valores ceratométricos como forma de medir a força corneana, é aceitável admitir que pacientes com doença avançada poderiam apresentar menores taxas de eficácia do procedimento. Porém, nós demonstramos que além de trazer estabilidade da doença aos pacientes, o protocolo padrão de CXL com remoção do epitélio é seguro e efetivo ao longo dos anos em pacientes com ceratocone nos estágios 3 e 4 da classificação de Amsler-Krumeich.

Muitos estudos apresentam em seus critérios de exclusão pacientes com espessura corneana menor que 400 μm , o que muitas vezes excluía pacientes com doença avançada.⁴⁶ Após o advento da riboflavina hipoosmolar foi possível aumentar a espessura da córnea artificialmente em alguns casos e ter a segurança necessária para a realização do procedimento.⁴⁴

Em seu estudo, Koller et al,¹² associa um valor de K máximo $< 58\text{D}$ a menor taxa de falha do procedimento, apesar de existirem apenas 3 olhos com ceratometria $> 58\text{D}$ nesse estudo. Além disso, a literatura tem mostrado a efetividade do CXL em pacientes com ceratometria máxima maior que 58,00D (estágios avançados).^{39,47,49} Nossa média de valores de ceratometria apical foi de 64,00D. Dentre os 40 olhos com ceratocone avançado em nosso estudo, houve falha no tratamento de dois olhos (5%) após 48 meses de seguimento e apenas um olho (2,5%) perdeu duas linhas de visão. Por outro lado, quatro olhos (10%) ganharam duas linhas de visão após os 48 meses. Analisando

especificamente os casos que falharam em nosso estudo, trata-se de poucos olhos e sem similaridade entre eles, assim não foi possível identificar fatores específicos que atribuíssem a eles uma maior probabilidade de falha quando comparados ao restante dos olhos do estudo.

Tanto a AVSC quanto a AVCC permaneceram estáveis. Este mesmo comportamento já havia sido notado em estudos que compararam os resultados entre olhos com doença inicial e avançada, porém com seguimento de apenas 12 meses e não analisaram a contagem de células endoteliais.^{48,50} O fato de a acuidade visual permanecer estável representa um grande benefício para os pacientes com ceratocone avançado já que o CXL pode prevenir ou pelo menos postergar a necessidade de um transplante de córnea. A recuperação visual e a estabilidade na curvatura da córnea também facilitam a adaptação de lentes de contato ao longo do tempo.⁵¹

Aproximadamente um terço dos olhos deste estudo apresentaram aplanamento dos valores ceratométricos do Kapical maior que 1,00 D em diferentes momentos do seguimento. A literatura tem mostrado que remodelamento ainda maior pode ser esperado nesse grupo de olhos com anormalidades topográficas marcantes e estágios avançados da doença.^{39,40,50} As córneas que apresentam sinais de doença mais severa (representadas topograficamente por córneas mais curvas)^{47,52} são teoricamente mais propícias aos efeitos de remodelamento, que inclusive pode perdurar por muitos anos após a cirurgia e atingir valores de até 14,00 D.³⁹ Este efeito pode variar de acordo com a concentração de riboflavina no estroma ou com o tempo de exposição a luz UV-A.⁵³

A combinação do aumento regional do módulo elástico do tecido,^{41,54} da profundidade efetiva do CXL⁵⁴, e da localização central do cone,^{41,55} provavelmente explica o efeito de aplanamento focal da córnea. Teoricamente, o aumento da rigidez associado ao CXL reduz a tensão da região central da córnea e desloca o foco de tensão máxima para o limbo, permitindo, em última análise, o aplanamento central da córnea e tendência a hipermetropização.⁵⁴

A irregularidade da córnea em estágios avançados de ceratocone dificulta a análise topográfica, onde menos pontos são analisados, levando a menor reprodutibilidade, resultado de erros de medida de ceratometria e um efeito mais aparente no grupo avançado.⁵⁶ Portanto, não conseguimos excluir completamente que os resultados analisados como estabilidade, neste grupo particular de olhos em estágio avançado de ceratocone, poderiam ser resultado do equilíbrio entre uma ligeira progressão que pode ter sido, de fato, compensada ou mascarada pelo efeito de aplanamento esperado nesse grupo.

A classificação do ceratocone adotada em nosso estudo é a mais difundida mundialmente, o que não a torna a mais apropriada para as análises de estudos sobre crosslinking. Possivelmente, classificações que levem em consideração outros parâmetros, menos sujeitos a erros de aferição, poderiam nos trazer resultados mais precisos e passíveis de comparação com os demais trabalhos.

Os estudos com seguimento mais longo mostram que alterações paquimétricas podem ocorrer e tendem a ser discretas.^{57,60} Embora nosso estudo tenha apresentado uma redução estatisticamente significativa, a diferença entre a média da paquimetria no pré-operatório e após 48 meses de

cirurgia foi de 9 μ m, o que não representa uma mudança clínica significativa. As alterações iniciais na espessura da córnea podem estar relacionadas à compactação inicial do estroma sob o efeito do tratamento,⁵⁸ enquanto que um processo de afinamento contínuo poderia estar associado à progressão, apesar dos achados ceratométricos.

O presente estudo revelou ainda que as células endoteliais não sofreram alterações significativas ao longo do período de seguimento. A reação fotoquímica e os radicais livres produzidos durante a combinação riboflavina + luz UV-A pode estar associada a morte celular dos ceratócitos e afetar as células endoteliais.⁽³¹⁾ Estudos com seguimento mais longo já mostraram que o CXL é um procedimento seguro e que apresenta apoptose dos ceratócitos até a profundidade de 350 μ m sem danos significativos às células endoteliais.⁶¹ Pacientes que apresentam córneas mais finas podem apresentar risco maior de redução das células endoteliais.⁶² Até aqui, este parâmetro ainda não havia sido estudado nesse grupo específico de pacientes com ceratocone.

7. Conclusão

1. De modo geral, este estudo mostrou que pacientes com ceratocone nos estágios avançados da doença, submetidos ao CXL corneano realizado seguindo o protocolo padrão, podem se beneficiar com a estabilidade da acuidade visual e dos valores ceratométricos de forma segura. Estudos futuros com seguimento ainda mais longo poderão nos mostrar a perpetuação destes resultados.

2. A partir dos nossos resultados fica claro que valores ceratométricos mais altos que aqueles anunciados como preditores de falha no tratamento, podem se beneficiar da estabilidade conferida pelo tratamento com CXL e que, desde que não haja contraindicações específicas, esses pacientes podem ser submetidos a cirurgia com grandes possibilidades de resultado positivo.

8. Anexos

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **ANÁLISE DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DO CROSSLINKING CORNEANO EM PACIENTES COM CERATOCONE AVANÇADO**

2. PESQUISADOR : PROF. DR. MARCONY RODRIGUES DE SANTHIAGO

CARGO/FUNÇÃO: Orientador do Programa de Pós-Graduação - Oftalmologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

UNIDADE DO HCFMUSP: Depto. de Oftalmologia e Otorrinolaringologia - FMUSP.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☒	RISCO MAIOR	☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Você está sendo convidado à participar de um estudo a respeito de um tratamento cirúrgico que visa interromper a piora da doença Ceratocone e outras Ectasias da Córnea. Doenças que se caracterizam por uma piora da visão devido a um encurvamento progressivo e afinamento da córnea, que pode chegar a ter um formato semelhante a um cone.

A sua doença têm como característica evoluir de maneira progressiva, muitos pacientes podem até vir a necessitar de um transplante. Por esse motivo, sugerimos um tratamento que leva o nome de Crosslinking de colágeno. Este é o único tratamento com comprovação científica, capaz de impedir a piora da doença e evitar assim tratamentos e cirurgias com maiores chances de complicação. Neste estudo, faremos a análise dos resultados após a cirurgia de crosslinking, para que seja publicado e reconhecido como um tratamento eficaz em outros centros médicos.

- Comparação da acuidade visual (visão) do paciente com e sem correção (grau) antes e após o procedimento.
- Comparação do comportamento da curvatura da córnea, através da análise da topografia de córnea (exame de imagem que demonstra o comportamento típico dessa doença, encurvar cada vez mais até assumir um aspecto semelhante a um “cone”, que tende a ser cada vez maior. É exatamente por esse motivo que a visão tende a piorar cada vez mais).
- Comparação da espessura da córnea através da paquimetria ultrassônica (a medida desse exame é alcançada por meio de aparelho que após anestesia em colírio, é colocado em contato com a córnea).

As possíveis reações adversas dessa técnica seriam ressecamento ocular (revertido com o uso de lubrificante ocular sem conservantes), ceratite puntata (revertida com o uso de lubrificante oculares sem conservantes e gel reepitelizante), haze estromal (cicatriz, cuja tendência é ter resolução espontânea entre os seis e doze primeiros meses após o tratamento e quando não, usar colírios de corticoesteróides ou imunomoduladores como a ciclosporina) e por último, a cirurgia não ser capaz de evitar a piora do quadro, sendo que essa piora na maioria das vezes é esperada caso não seja utilizada essa técnica, que é a única na literatura que mostra resultados eficazes capaz de interromper a evolução do quadro

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é **Prof. Dr. Marcony R. Santhiago** que poderá ser encontrado na Clínica OftalmoRio, situado à Rua Pinheiro Guimarães, 43 - Botafogo - Rio de Janeiro/RJ - CEP: 22281-080 - Tel.: (21) 3043-0200 e a INVESTIGADORA EXECUTANTE é a **Dra Natalia Torres Giacomini** que poderá ser encontrado no endereço Rua Pinheiro Guimarães, 43 - Botafogo - Rio de Janeiro/RJ - CEP: 22281-080 | Tel.: (21) 3043-0200.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PAULO

Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP do Hospital de Clínicas – HC/FMUSP, durante horário comercial, no seguinte endereço: **Instituto do Câncer do Estado de São Paulo “Octávio Frias de Oliveira” - 21º andar – sala 36 -**

Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP - CEP: 01246-000 - tel: 3893-4401 / 3893-4407 – E-mail: cep.fm@usp.br . O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Natalia Torres Giacomini ou Marcony Rodrigues de Santiago ou a pessoa por eles delegada Marcelo Vieira Netto sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

----- Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

----- Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

----- Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO B– PARECER CONSUBSTACIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTACIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da eficácia e segurança do Crosslinking corneano em pacientes com ceratocone avançado

Pesquisador: Marcony Rodrigues de Santhiago

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 57802316.6.0000.0065

Instituição Proponente: Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.818.405

Apresentação do Projeto:

Este é um projeto retrospectivo baseado em prontuário, com finalidade acadêmica de doutorado, em pacientes com diagnóstico de ceratocone avançada para estudar a eficácia do tratamento com a técnica convencional de cross-linking corneana realizada na entidade externa nacional no estado de Rio de Janeiro, o OftalmoRio Centro de Microcirurgia Ocular, com aval documentado do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da USP com a chancela e aprovação da Divisão da Clínica Oftalmológica do HCFMUSP. O projeto está bem delineado com os critérios adequados de inclusão e exclusão e com avaliações pré e pós-cirúrgicas baseadas em medidas quantitativas de parâmetros corneanos e com recrutamento e inclusão de 40 olhos de 40 pacientes com diagnóstico de ceratocone de evolução bem documentada na casuística. No projeto declara-se que todos os pacientes assinaram o formulário de consentimento informado.

Os procedimentos clínicos e cirúrgicos estão bem descritos e seguem as práticas preconizadas para tratamento de ceratocone.

O critério de avaliação da eficácia parece ser adequado baseado em medidas e análise quantitativa dos valores de ceratometria ao longo do seguimento, enquanto a segurança do procedimento foi garantida pela avaliação da acuidade visual e contagem de células endoteliais.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 1.818.405

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar por estudo retrospectivo a eficácia e segurança da técnica convencional cross-linking corneana em pacientes com ceratocone avançada.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa é retrospectivo e não envolve riscos adicionais. O benefício do projeto é indireto na medida que poderão beneficiar as tomadas de decisão no tratamento de futuros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante e está bem elaborado. Não se detecta óbices éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE apresentado parece ser adequado em conformidade com Resoluções 466/12.

Recomendações:

Recomenda-se pela aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ente é um estudo retrospectivo em que foram ou serão obtidos autorização de uso de dados por meio de TCLE e não se observa nenhum óbice ético.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_745115.pdf	13/10/2016 14:29:11		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Protocolo_Crosslinking_X_Ceratocone_Avancado_05_10_2016.doc	13/10/2016 14:24:00	Marcony Rodrigues de Santhiago	Aceito
Outros	CARTA_CEPFMUSP_envio_TCLE_alterado_05_10_16.doc	13/10/2016 14:21:10	Marcony Rodrigues de Santhiago	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTA_CEPFMUSP_RESPOSTA_PARA_ECER.doc	22/09/2016 11:43:43	Marcony Rodrigues de Santhiago	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Protocolo_Crosslinking_X_Ceratocone_Avancado.doc	22/09/2016 11:41:21	Marcony Rodrigues de Santhiago	Aceito
Outros	Cadastro_CEPFMUSP_Protocolo_15147.pdf	30/06/2016 15:05:37	Marcony Rodrigues de Santhiago	Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.818.405

Outros	Oficio_229_Aprovacao_Depto_Oftalmologia.pdf	30/06/2016 15:04:59	Marcony Rodrigues de Santhiago	Aceito
Folha de Rosto	FR_Protocolo_Registro_15147.pdf	30/06/2016 15:04:26	Marcony Rodrigues de Santhiago	Aceito
Outros	Anexo_Declaracao_OftalmoRio.doc	27/06/2016 07:35:08	Marcony Rodrigues de Santhiago	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_Crosslinking_X_Ceratocone_Avancado-versao_30_05_16.doc	27/06/2016 07:34:52	Marcony Rodrigues de Santhiago	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 09 de Novembro de 2016

Assinado por:

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)**

9. Referências Bibliográficas

1. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998;42(4):297-319.
2. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol*. 1984;28(4):293-322.
3. Seiler T, Quurke AW. Iatrogenic keratectasia after LASIK in a case of forme fruste keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 1998;24(7):1007-9.
4. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*. 1998;66(1):97-103.
5. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003;135(5):620-7.
6. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg*. 2008;34(5):796-801.
7. Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ, Snibson GR. A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results. *J Refract Surg*. 2008;24(7):S720-5.
8. Raiskup F, Theuring A, Pillunat LE, Spoerl E. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus: ten-year results. *J Cataract Refract Surg*. 2015;41(1):41-6.
9. Zhang Y, Conrad AH, Conrad GW. Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. *J Biol Chem*. 2011;286(15):13011-22.
10. Hafezi F, Koller T, Vinciguerra P, Seiler T. Marked remodelling of the anterior corneal surface following collagen cross-linking with riboflavin and UVA. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(8):1171-2.
11. Krumeich JH, Daniel J, Knülle A. Live-epikeratophakia for keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 1998;24(4):456-63.
12. Koller T, Mrochen M, Seiler T. Complication and failure rates after corneal crosslinking. *J Cataract Refract Surg*. 2009;35(8):1358-62.
13. Binder PS, Lindstrom RL, Stulting RD, Donnenfeld E, Wu H, McDonnell P, et al. Keratoconus and corneal ectasia after LASIK. *J Refract Surg*.

- 2005;21(6):749-52.
14. Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Wittig C, Pillunat LE. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32(2):279-83.
 15. Daxer A, Fratzl P. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implication in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(1):121-9.
 16. Meek KM, Blamires T, Elliott GF, Gyi TJ, Nave C. The organisation of collagen fibrils in the human corneal stroma: a synchrotron X-ray diffraction study. *Curr Eye Res*. 1987;6(7):841-6.
 17. Sherwin T, Brookes NH. Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. *Clin Exp Ophthalmol*. 2004;32(2):211-7.
 18. Chaerkady R, Shao H, Scott SG, Pandey A, Jun AS, Chakravarti S. The keratoconus corneal proteome: loss of epithelial integrity and stromal degeneration. *J Proteomics*. 2013;87:122-31.
 19. Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res*. 1980;31(4):435-41.
 20. Gefen A, Shalom R, Elad D, Mandel Y. Biomechanical analysis of the keratoconic cornea. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009;2(3):224-36.
 21. Raiskup F, Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf*. 2013;11(2):65-74.
 22. Richoz O, Mavrakanas N, Pajic B, Hafezi F. Corneal collagen cross-linking for ectasia after LASIK and photorefractive keratectomy: long-term results. *Ophthalmology*. 2013;120(7):1354-9.
 23. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T. Long-term results of riboflavin ultraviolet a corneal collagen cross-linking for keratoconus in Italy: the Siena eye cross study. *Am J Ophthalmol*. 2010;149(4):585-93.
 24. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T, Denaro R, Balestrazzi A. Riboflavin-UVA-induced corneal collagen cross-linking in pediatric patients. *Cornea*. 2012;31(3):227-31.
 25. Seiler T, Huhle S, Spoerl E, Kunath H. Manifest diabetes and keratoconus: a retrospective case-control study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*.

- 2000;238(10):822-5.
26. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006;17(4):356-60.
 27. Kamaev P, Friedman MD, Sherr E, Muller D. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(4):2360-7.
 28. Pacifici RE, Davies KJ. Protein degradation as an index of oxidative stress. *Methods Enzymol*. 1990;186:485-502.
 29. Remé C, Reinboth J, Clausen M, Hafezi F. Light damage revisited: converging evidence, diverging views? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1996;234(1):2-11.
 30. Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, Caporossi T, Caporossi A. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *J Cataract Refract Surg*. 2009;35(5):893-9.
 31. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*. 2007;26(4):385-9.
 32. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi O, Bovone C, Sparano MC, et al. Corneal healing after riboflavin ultraviolet-A collagen cross-linking determined by confocal laser scanning microscopy in vivo: early and late modifications. *Am J Ophthalmol*. 2008;146(4):527-33.
 33. Kymionis GD, Grentzelos MA, Plaka AD, Tsoulnaras KI, Diakonis VF, Liakopoulos DA, et al. Correlation of the corneal collagen cross-linking demarcation line using confocal microscopy and anterior segment optical coherence tomography in keratoconic patients. *Am J Ophthalmol*. 2014;157(1):110-5.e1.
 34. Mazzotta C, Traversi C, Paradiso AL, Latronico ME, Rechichi M. Pulsed Light Accelerated Crosslinking versus Continuous Light Accelerated Crosslinking: One-Year Results. *J Ophthalmol*. 2014;2014:604731.
 35. Reinstein DZ, Gobbe M, Archer TJ, Couch D. Epithelial thickness profile as a method to evaluate the effectiveness of collagen cross-linking treatment after corneal ectasia. *J Refract Surg*. 2011;27(5):356-63.
 36. Reinstein DZ, Gobbe M, Archer TJ, Silverman RH, Coleman DJ. Epithelial, stromal, and total corneal thickness in keratoconus: three-dimensional

- display with artemis very-high frequency digital ultrasound. *J Refract Surg.* 2010;26(4):259-71.
37. Rocha KM, Perez-Straziota CE, Stulting RD, Randleman JB. Epithelial and stromal remodeling after corneal collagen cross-linking evaluated by spectral-domain OCT. *J Refract Surg.* 2014;30(2):122-7.
38. Li Y, Tan O, Brass R, Weiss JL, Huang D. Corneal epithelial thickness mapping by Fourier-domain optical coherence tomography in normal and keratoconic eyes. *Ophthalmology.* 2012;119(12):2425-33.
39. Santhiago MR, Giacomini NT, Medeiros CS, Smadja D, Bechara SJ. Intense Early Flattening After Corneal Collagen Cross-linking. *J Refract Surg.* 2015;31(6):419-22.
40. Kymionis GD, Tsoulnaras KI, Liakopoulos DA, Paraskevopoulos TA, Kouroupaki AI, Tsilimbaris MK. Excessive Corneal Flattening and Thinning After Corneal Cross-linking: Single-Case Report With 5-Year Follow-up. *Cornea.* 2015;34(6):704-6.
41. Roy AS, Dupps WJ. Patient-specific computational modeling of keratoconus progression and differential responses to collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):9174-87.
42. Holopainen JM, Krootila K. Transient corneal thinning in eyes undergoing corneal cross-linking. *Am J Ophthalmol.* 2011;152(4):533-6.
43. Hafezi F, Mrochen M, Iseli HP, Seiler T. Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(4):621-4.
44. Hafezi F. Limitation of collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution: failure in an extremely thin cornea. *Cornea.* 2011;30(8):917-9.
45. Randleman JB, Khandelwal SS, Hafezi F. Corneal cross-linking. *Surv Ophthalmol.* 2015;60(6):509-23.
46. Vinciguerra R, Romano MR, Camesasca FI, Azzolini C, Trazza S, Morenghi E, et al. Corneal cross-linking as a treatment for keratoconus: four-year morphologic and clinical outcomes with respect to patient age. *Ophthalmology.* 2013;120(5):908-16.
47. Greenstein SA, Hersh PS. Characteristics influencing outcomes of corneal collagen crosslinking for keratoconus and ectasia: implications for patient

- selection. *J Cataract Refract Surg*. 2013;39(8):1133-40.
48. Arora R, Jain P, Goyal JL, Gupta D. Comparative Analysis of Refractive and Topographic Changes in Early and Advanced Keratoconic Eyes Undergoing Corneal Collagen Crosslinking. *Cornea*. 2013;32(10):1359-64.
49. Ivarsen A, Hjortdal J. Collagen cross-linking for advanced progressive keratoconus. *Cornea*. 2013;32(7):903-6.
50. Sloot F, Soeters N, van der Valk R, Tahzib NG. Effective corneal collagen crosslinking in advanced cases of progressive keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2013;39(8):1141-5.
51. Schornack MM, Patel SV. Scleral lenses in the management of keratoconus. *Eye Contact Lens*. 2010;36(1):39-44.
52. Koller T, Pajic B, Vinciguerra P, Seiler T. Flattening of the cornea after collagen crosslinking for keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37(8):1488-92.
53. Ozgurhan EB, Sezgin Akcay BI, Yildirim Y, Karatas G, Kurt T, Demirok A. Evaluation of corneal stromal demarcation line after two different protocols of accelerated corneal collagen cross-linking procedures using anterior segment optical coherence tomography and confocal microscopy. *J Ophthalmol*. 2014;2014:981893.
54. Roy AS, Dupps WJ. Effects of altered corneal stiffness on native and postoperative LASIK corneal biomechanical behavior: A whole-eye finite element analysis. *J Refract Surg*. 2009;25(10):875-87.
55. Greenstein SA, Fry KL, Hersh PS. Effect of topographic cone location on outcomes of corneal collagen cross-linking for keratoconus and corneal ectasia. *J Refract Surg*. 2012;28(6):397-405.
56. Hashemi H, Yekta A, Khabazkhoob M. Effect of keratoconus grades on repeatability of keratometry readings: Comparison of 5 devices. *J Cataract Refract Surg*. 2015;41(5):1065-72.
57. Poli M, Cornut PL, Balmitgere T, Aptel F, Janin H, Burillon C. Prospective study of corneal collagen cross-linking efficacy and tolerance in the treatment of keratoconus and corneal ectasia: 3-year results. *Cornea*. 2013;32(5):583-90.
58. Greenstein SA, Shah VP, Fry KL, Hersh PS. Corneal thickness changes

- after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: one-year results. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37(4):691-700.
59. Hashemi H, Seyedian MA, Miraftab M, Fotouhi A, Asgari S. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet a irradiation for keratoconus: long-term results. *Ophthalmology*. 2013;120(8):1515-20.
60. Kymionis GD, Grentzelos MA, Liakopoulos DA, Paraskevopoulos TA, Klados NE, Tsounaras KI, et al. Long-term follow-up of corneal collagen cross-linking for keratoconus--the Cretan study. *Cornea*. 2014;33(10):1071-9.
61. Mazzotta C, Balestrazzi A, Baiocchi S, Traversi C, Caporossi A. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: in vivo confocal microscopic evaluation. *Clin Exp Ophthalmol*. 2007;35(6):580-2.
62. Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, Kounis GA, Panagopoulou SI, Grentzelos MA. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A irradiation in patients with thin corneas. *Am J Ophthalmol*. 2012;153(1):24-8.