THALES ANTONIO ABRA DE PAULA

Análise comparativa com microscopia de fluorescência de dois fótons da penetração da riboflavina em duas diferentes soluções: dextran e hidroxipropilmetilcelulose

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. Milton Ruiz Alves

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

De Paula, Thales Antonio Abra
Análise comparativa com microscopia de fluorescência de dois fótons da penetração da riboflavina em duas diferentes soluções : dextran e hidroxipropilmetilcelulose / Thales Antonio Abra De Paula. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oftalmologia.
Orientador: Milton Ruiz Alves.

Descritores: 1.Córnea 2.Ceratocone 3.Fluorescência 4.Riboflavina 5.Paquimetria corneana 6.Colágeno

USP/FM/DBD-138/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Ao meu filho **Thales Antonio Abra de Paula Filho**

que me ensinou o verdadeiro sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Antonio Soares de Paula Filho** e **Ivanete Sueli Abra de Paula** pelo apoio incondicional em todas etapas da minha vida, não medindo esforços e se privando de muitas coisas para eu estudar com as melhores condições.

À minha esposa **Elcieli Roma Lopes de Paula** que sempre esteve ao meu lado, me incentivou, possibilitou um ambiente familiar perfeito para meus estudos e me deu o maior presente da minha vida, meu filho.

Aos meus irmãos **Janaina Mirella Abra de Paula** e **Reisson Fabricio Abra de Paula** pelos incentivos desde a infância.

Ao professor **Fernando Betty Cresta** pela confiança durante toda minha trajetória na Oftalmologia da Universidade de São Paulo.

Ao meu orientador professor **Milton Ruiz Alves** pelo incentivo, dedicação, orientação e paciência na realização de um sonho. Não tenho palavras para expressar minha gratidão.

À **Regina Ferreira de Almeida** pela dedicação e trabalho exemplar na pós-graduação.

Agradeço a **Deus** e **São Judas Tadeu** pela benção da vida.

Agradeço a todos **professores** que participaram da minha educação desde minha infância em Tanabi-SP.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Jornal 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 Júlia de A. L. Freddi; Maria F. Crestana; Marinalva de Souza Aragão; Suely Campos Cardoso; Valéria Vilhena. 3. ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviatura dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas
Lista de tabelas
Lista de figuras
Lista de gráficos
Resumo
Abstract
1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVOS 6
2.1 Objetivo geral 7
2.2 Objetivos específicos 7
3 REVISÃO DE LITERATURA 8
3.1 Crosslinking da córnea 9
3.2 Radiação UVA 11
3.3 Riboflavina 12
3.4 Crosslinking acelerado 13
3.5 Microscopia multifóton 14
4 MÉTODOS 16
4.1 Aspectos éticos 17
4.2 Tipo de estudo e amostra 17
4.3 Critérios de inclusão 17
4.4 Critérios de exclusão 18
4.5 Soluções de riboflavina 18
4.6 Montagem da câmara artificial 19
4.7 Deturgescência da córnea 19

4.8 Aplicação da riboflavina 20
4.9 Microscópio multifóton 21
4.10 Determinação da concentração da riboflavina 24
4.11 Análise estatística 24
5 RESULTADOS 25
6 DISCUSSÃO 33
7 CONCLUSÃO 39
8 ANEXOS 41
9 REFERÊNCIAS 43
10 APÊNDICES 51

LISTAS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

au:	unidade arbitrária
AV:	acuidade visual
BUT:	tempo de rompimento do filme lacrimal
CLX:	crosslinking de colágeno corneano
D:	dioptria
FI:	intensidade de fluorescência
HPMC:	hidroxipropilmetilcelulose
KC:	ceratocone
Min:	minuto(s)
nm:	nanômetro
SHG:	Second Harmonic Generation
TPF:	fluorescência de dois fótons
UV:	radiação ultravioleta
UVA:	radiação ultravioleta A
UVB:	radiação ultravioleta B
UVC:	radiação ultravioleta C
μm:	micrômetro

TABELAS

Tabela 1 - Comparação da espessura média da córnea obtida por paquimetria ultrassônica central após a estabilização da córnea antes da aplicação de riboflavina (Antes) e após o uso de riboflavina dextran por 30 min e riboflavina HPMC por 10 min (Depois). (Média ± Erro Padrão)..... 32

FIGURAS

Figura 1 - Disco corneoescleral montado na câmara artificial 19

Figura 2 - Imagem do microscópio multifóton com todos seus módulos 21

Figura 3 - Imagem 3D da córnea após saturação com riboflavina em HPMC. Imagem da microscopia multifóton processada com pacote de imagens Fiji. A intensidade de fluorescência é caracterizada pela cor verde. Riboflavina diminui com o aumento da profundidade 23

Figura 4 - Imagem da tela do microscópio multifóton mostrando cortes em profundidades diferentes da córnea. Observamos inferiormente os cortes mais superficiais que apresentam maior FI da riboflavina. Com o aumento da profundidade a FI diminui progressivamente que pode ser verificado nos cortes mais superiores da tela 23

GRÁFICOS

Gráfico 1 - FI no grupo HPMC por 10 minutos e após a saturação da córnea 26

Gráfico 2 - FI no grupo de dextran por 30 minutos e após a saturação corneana 27

Gráfico 3 - Curvas de concentração de riboflavina nos grupos HPMC (azul) e dextran (laranja) 29

Gráfico 4 - Ajuste de curva linear: grupos HPMC (azul) e dextran (laranja) 30

Gráfico 5 - Área correspondente à concentração total de riboflavina da córnea 31

RESUMO

De Paula TAA. *Análise comparativa com microscopia de fluorescência de dois fótons da penetração da riboflavina em duas diferentes soluções*: dextran e hidroxipropilmetil-celulose [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

OBJETIVO: Este estudo comparou a penetração de riboflavina em córneas porcinas utilizando duas soluções diferentes: dextran e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). **MÉTODOS:** Foi realizada a deturgescência das córneas suínas e depois preparadas em câmara anterior artificial preenchida com solução salina balanceada. A pressão da câmara artificial foi verificada com um tonômetro portátil. As córneas porcinas receberam riboflavina a 0,1%, em solução de dextran a 20%, por 30 minutos (protocolo de Dresden) ou riboflavina a 0,1%, em solução de HPMC a 1%, por 10 minutos. A intensidade de fluorescência captada pela microscopia multifóton foi utilizada para avaliar a concentração da riboflavina a 0,1% na córnea. A espessura da córnea foi avaliada pela paquimetria ultrassônica antes e após o uso de riboflavina a 0,1%. **RESULTADOS**: Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos quando considerada toda a espessura corneana estudada ($p = 0,528$). A concentração de riboflavina até 340 μm foi maior no grupo HPMC ($p = 0,146$). De 340 μm a 500 μm, a concentração foi maior no grupo de dextran ($p = 0,248$). As medidas paquimétricas no grupo com dextran mostraram diminuição de 12,9% na espessura da córnea após 30 min, enquanto o grupo HPMC apresentou aumento de 9,1% após 10 min. **CONCLUSÃO:** Riboflavina a 0,1% em solução de HPMC a 1% por 10 minutos apresentou o mesmo nível de segurança e eficácia na saturação da córnea quando comparado ao protocolo de Dresden, logo penetra mais rápido. A paquimetria ultrassônica no crosslinking do colágeno corneano tem importância fundamental no controle da hidratação da córnea devido as alterações na espessura causadas pelos diferentes tipos de solução de riboflavina. Este estudo utilizou métodos diferentes dos anteriores para melhor simular as condições fisiológicas da córnea e também utilizamos solução HPMC 1% que difere dos estuos prévios feitos com HPMC 1,1%.

Descritores: Córnea; Ceratocone; Fluorescência; Riboflavina; Paquimetria corneana; Colágeno.

ABSTRACT

De Paula TAA. *Comparative two-photon fluorescence microscopy analysis of riboflavin penetration in two different solutions*: dextran and hydroxypropyl methylcellulose [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

PURPOSE: This study compared riboflavin penetration in porcine corneas using two different solutions: dextran and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). **METHODS:** Porcine corneas were de-swollen and after prepared in an artificial anterior chamber with balanced saline solution. The pressure was checked with a portable tonometer. Porcine corneas received 0.1% riboflavin in 20% dextran for 30 minutes (Dresden protocol) or 0.1% riboflavin in 1% HPMC for 10 minutes. By multiphoton microscopy, the fluorescence intensity was used to evaluate concentration into the cornea, and ultrasonic pachymetry was performed before and after using riboflavin. **RESULTS:** There was no statistically significant difference between the groups when considering all the corneal thickness studied (p 0.528). Riboflavin concentration up to 340 µm was higher in the HPMC group (p 0.146). From 340 µm to 500 µm the concentration was higher in the dextran group (p 0.248). Pachymetric measurements in the group with dextran showed a decrease of 12.9% in corneal thickness after 30 min, while the HPMC group showed an increase of 9.1% after 10 min. **CONCLUSION:** 1% HPMC riboflavin for 10 min had the same level of safety and effectiveness in soaking when compared to the Dresden protocol, so it penetrates the cornea faster during soaking. Ultrasonic pachymetry in corneal collagen crosslinking has fundamental importance in controlling corneal hydration due to changes in thickness caused by different types of riboflavin. This study used different methods than previous studies to better simulate corneal physiological conditions and used 1% HPMC concentration which differs previous studies performed with 1.1% HPMC.

Descriptors: Cornea; Keratoconus; Fluorescence; Riboflavin; Corneal pachymetry; Collagen.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O ceratocone (KC) é definido como uma condição ectásica que cursa com deformação coniforme da córnea e astigmatismo irregular miópico, provocando a percepção de imagens distorcidas [1, 2]. Trata-se de afecção tipicamente bilateral, com evolução assimétrica que cursa com afinamento e encurvamento da córnea [3-4]. O KC pode estar associado a outras doenças sistêmicas como atopia [5-6], síndrome de Down [7], síndrome de Ehlers-Danlos [7], *osteogenesis imperfecta* [7] e síndrome de Marfan [2].

Clinicamente, pacientes com KC geralmente apresentam perda visual e fotofobia. Nos casos iniciais não são observadas anormalidades no exame biomicroscópico em lâmpada de fenda que estarão presentes nos casos moderados a graves como afinamento do estroma, estrias de Vogt (linhas verticais na membrana do estroma profundo / Descemet) e anel Fleischer (depósitos de ferro no epitélio) pode ser visível. Em casos avançados de KC podem ocorrer rupturas na membrana de Descemet causando edema estromal, conhecido como hidropsia. O sinal de Munson (a pálpebra inferior é empurrada em formato cônico no olhar para baixo devido a forma cônica da córnea) e o sinal de Rizzuti (reflexo cônico da luz) são sinais presentes em KC avançados.

O agravamento do KC pode levar a piora na qualidade de vida, afetando a leitura e o bem estar emocional do paciente [8]. São alterações histopatológicas do KC: degeneração epitelial das células basais, fragmentação ou interrupção da camada de Bowman, diminuição das lamelas de colágeno estromais, alteração na membrana de

Descemet, adelgaçamento epitelial, pleomorfismo endotelial além de cicatrizes em casos mais avançados [9].

Desde a sua primeira descrição, em 1748, pelo alemão Burchard Mauchart, o KC teve grandes avanços no seu diagnóstico e tratamento [10]. O tratamento do KC deve ser individualizado para cada paciente, sendo muito importante o controle do prurido ocular por meio de medidas comportamentais e colírios [5-6]. A acuidade visual (AV) pode ser melhorada por métodos que podem ser clínicos (óculos e lentes de contato) e/ou cirúrgicos (implante de anel intraestromal ou transplante de córnea) [2-4]. O crosslinking da córnea (CXL) é o procedimento cirúrgico, atualmente, utilizado para estabilizar a progressão do KC [11].

O CXL, também, tem sido utilizado tanto para controlar a progressão de afecções ectásicas da córnea (KC, degeneração marginal pelúcia, ceratoglobo e ectasia pós-cirurgia refrativa), como para tratar ceratites infecciosas e ceratopatia bolhosa [10].

O CXL consiste no processo no qual uma combinação entre um fotoindutor (luz ultravioleta), e uma reação fotoquímica leva a indução de radicais livres, que conduz a uma ligação química entre as fibras de colágeno, formando estruturas tridimensionais mais rígidas [12]. A reticulação polimérica corneana ocorre, portanto, na presença de radiação ultravioleta A (UVA) (365-370 nm) e a riboflavina atua nesse processo como catalisadora da reação sem causar efeito citotóxico direto no estroma da córnea [13]. A espessura corneana mínima para a realização do CXL é 400 μm sem epitélio [14-16].

Spoerl et al. conduziram o primeiro estudo experimental que mostrou o uso do CXL do colágeno corneano. [17] em córneas porcinas promovendo seu enrijecimento.

Posteriormente, outros estudos prospectivos relataram os mesmos resultados em pacientes com KC [18-20].

Atualmente, procura-se reduzir o tempo total de realização do CXL por meio da diminuição do tempo de irradiação com UVA. O CXL acelerado é fundamentado na lei de Bunsen-Roscoe em que o efeito biológico de uma reação fotoquímica é diretamente proporcional a dose total de energia. A dose é o produto da intensidade e duração da exposição, buscando-se assim acelerar o processo de reticulação através do aumento de energia e diminuição do tempo [21].

A riboflavina atua como agente fotossensibilizador e protetor contra a radiação UVA para o endotélio, cristalino e retina. A penetração da riboflavina é uma etapa fundamental para proteção do endotélio corneano e de estruturas intraoculares durante o procedimento. O aprimoramento da técnica do CXL vem ocorrendo com a utilização de diferentes soluções de riboflavina, o que tem possibilitado novos avanços e requerido novos estudos para se ter uma melhor compreensão do comportamento das diversas soluções riboflavinas no tecido corneano. Inicialmente, as soluções de riboflavina eram produzidas com dextran a 20%, porém, nos últimos anos houve mudança para a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) a 1,1%.

A microscopia multifóton possibilita avaliar a penetração da riboflavina na córnea [22-24]. Trata-se de técnica de microscopia óptica não linear que utiliza uma fonte de iluminação próxima do infravermelho pulsada, a femtosegundo. Pode ser usada para a detecção de fluorescência (autofluorescência de tecidos, células expressando proteínas fluorescentes, ou de agentes de contraste exógenos) e para a captação de imagens utilizando um fenômeno óptico de alta ordem de espalhamento caracterizado pela dupla frequência em que um fóton interage com um meio gerando novos fótons

com dobro da frequência e metade do comprimento de onda, conhecido como “Second Harmonic Generation” (SHG). Materiais biológicos como o colágeno e nervos periféricos são bons geradores de SHG [25].

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

Considerando que o aprimoramento da técnica do CXL vem ocorrendo com a utilização de diferentes tipos de riboflavina e que há a necessidade de buscar evidências que melhorem a nossa compreensão do comportamento das diversas soluções no tecido corneano, nos propomos aos seguintes objetivos:

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a difusão estromal de riboflavina em córneas porcinas utilizando duas soluções diferentes: dextran e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a fluorescência emitida pelas duas soluções de riboflavina no estroma corneano com o emprego de microscopia multifóton.
- Avaliar a concentração estromal das duas soluções de riboflavina com o emprego de microscopia multifóton: riboflavina em HPMC por 10 minutos versus riboflavina em dextran por 30 minutos.
- Avaliar mudanças na espessura da córnea durante o embebimento com as diferentes soluções de riboflavina com o emprego de paquimetria ultrassônica.

3 Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Crosslinking da córnea

Dá-se o nome de CXL ao processo de formação de ligações covalentes intra e intermoléculas do colágeno do estroma corneano. Esse processo, também, ocorre durante o envelhecimento e em pacientes diabéticos, devido a uma glicalização enzimática das fibras do colágeno [17].

O primeiro estudo do CXL em humanos envolveu 22 pacientes (23 olhos) com KC de graus moderados a avançados e mostrou que 16 olhos (70%) tiveram redução na ceratometria máxima em 2 D e 15 olhos (65%) apresentaram melhora da AV [26]. Estudos com maior número de pacientes e com seguimento mais longo demonstraram que o CXL foi capaz de estabilizar o KC e as ectasias pós-refrativas por um período de 1 a 5 anos após o tratamento [27-31].

Controvérsias permanecem no procedimento e nas suas variações técnicas. A reticulação polimérica da córnea ocorre na presença de radiação UVA (que atua como fotoindutor da reação), riboflavina e oxigênio [13]. A espessura corneana mínima para o procedimento é de 400 µm após remover epitélio [32-34], que permite um nível aceitável de segurança ao considerar o comprimento de onda e o tempo de exposição da córnea ao UVA.

No protocolo de Dresden utilizou-se a riboflavina a 0,1% em dextran a 20% em córneas desepitelizadas e irradiadas com UVA (370 nm) a 3 mW/cm^2, durante 30 minutos, gerando uma dose total de 5,4 J/cm^2 [26]. Spoerl et al. demonstraram que essa

intensidade de UVA estava muito abaixo do limiar de dano para o endotélio da córnea, assim como para a íris, cristalino e retina [35].

O CXL é um procedimento seguro com baixo risco de complicações, foi aprovado no Brasil pelo Ministério da Saúde em março de 2017 (Portaria n. 486 de 06/03/2017) e nos Estados Unidos, em abril de 2016, pelo Food and Drug Administration.

O CXL está indicado nos pacientes com doença em progressão nas seguintes condições: aumento da ceratometria máxima maior que 1,00 D em 12 meses (mais utilizado), ou aumento de pelo menos 1,00 D nos parâmetros ceratométricos (K1, K2 ou K médio) em 12 meses ou de 0,75D em 6 meses; aumento de miopia de -0,75D em 12 meses e/ou na perda de pelo menos duas linhas da melhor AV corrigida em 12 meses e redução de espessura paquimétrica no ponto mais fino maior que 5 µm em um ano [36].

Os resultados obtidos nos primeiros estudos experimentais mostraram apoptose dos ceratócitos até a profundidade de 300 µm na córnea [35]. O aumento das ligações covalentes entre as fibras de colágeno resultou em maior estabilidade biomecânica da córnea [17]. Considerando o início do KC, em geral, na segunda década de vida e a sua natureza progressiva, Leoni-Mesplie et al. mostraram que pacientes pediátricos podem beneficiar-se do tratamento com o CXL devido a maior progressão dos parâmetros ceratométricos em pacientes mais jovens [37]. Todavia, acompanhamento maior sugere que apesar da estabilização inicial do ceratocone, pacientes pediátricos podem apresentar progressão do KC no longo prazo necessitando de retratamentos [38].

Estudos adicionais continuam sendo necessários e deverão ter o foco no desenvolvimento de técnicas e de um protocolo apropriado, para a obtenção de resultados duradouros, eficazes e seguros em pacientes de todas as faixas etárias. Atualmente, o CXL tem sido mais indicado no KC em progressão documentada na população adulta e em ectasia pós-cirurgia refrativa. E, a sua indicação é feita com reservas em pacientes com a melhor AV corrigida de 20/25 ou melhor, em qualquer idade, pois o CXL pode cursar com piora da visão devido ao risco de opacidade de córnea .

O êxito do CXL tem sido avaliado por meio da estabilidade dos parâmetros ceratométricos, porém na maioria dos estudos os resultados mostram diminuição dos valores da ceratometria máxima e melhora da melhor AV corrigida. O CXL é uma alternativa terapêutica promissora que oferece vantagens clínicas, econômicas e psicossociais, além de poder ser realizada em nível ambulatorial [39].

3.2 Radiação UVA

A luz solar é composta por espectro contínuo de radiação eletromagnética que atinge a terra após filtragem atmosférica. Apresenta divisão e denominação de acordo com o intervalo de comprimento de onda: radiação ultravioleta (UV) (100-400 nm), radiação visível (400-780 nm) e radiação infravermelha (maior que 780 nm) [40].

A luz UV é dividida em três regiões do espectro: UVA (315 - 400 nm), UVB (280 - 315 nm) e UVC (100 - 280 nm) [40]. Além da diferença de comprimento de onda, essas radiações são distintas quanto aos efeitos biológicos que promovem. A radiação UVC é basicamente germicida, pelo fato de ser absorvida por proteínas e aminoácidos,

mas contêm o pico de absorção da molécula do DNA (260 nm) e só não causa maior prejuízo pelo fato de ter curta penetração [40-42]. A UVB é a mais eficiente em produzir danos diretos ao DNA [40-42]. A UVA produz danos de forma não uniforme sendo dividida em duas regiões: UVA-1, compreendendo a faixa de absorção de 340 nm a 400 nm, e a UVA-2, entre 315 nm e 340 nm. A UVA-1, devido a sua maior capacidade de penetração, reage com o oxigênio molecular, produzindo espécies reativas capazes de induzir reações químicas [40-42].

A radiação utilizada no CXL é a UVA, com comprimento de onda entre 365 nm e 370 nm [26].

3.3 Riboflavina

A riboflavina funciona como um fotoindutor ótimo na reação bioquímica do CXL. Mesmo com ampla gama de absorção é segura para a circulação sistémica [43]. Trata-se de molécula relativamente grande e sua principal limitação é a penetração adequada no estroma da córnea através do epitélio íntegro, o que é fundamental para a sua ação eficaz.

A riboflavina (vitamina B2) é uma molécula hidrossolúvel com coloração amarela sendo também fluorescente. Tem a capacidade de participar de reações químicas com transferência de elétrons, sendo um agente fotossensível que ao absorver luz, alcança o estado excitado que pode tanto interagir com o oxigênio molecular gerando oxigênio ou agir diretamente sobre um substrato levando à foto-oxidação deste, gerando radicais intermediários, além de espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio [44].

Os radicais livres (espécies reativas de oxigênio) induzem ligações covalentes entre fibras de colágeno e/ou proteoglicanos. Outra função essencial da riboflavina nesse procedimento é o seu uso como filtro, protegendo estruturas como o cristalino, a retina e o endotélio da córnea [43].

A penetração de riboflavina é, portanto, um passo fundamental na proteção da córnea durante este procedimento. A concentração de riboflavina a 0,1% utilizada no CXL convencional sem epitélio foi estabelecida pelo protocolo de Dresden. Novas soluções de riboflavina foram desenvolvidas para utilização com o epitélio íntegro da córnea (epi-on). Para melhorar a penetração da riboflavina, que é uma molécula relativamente grande, utiliza-se a concentração de 0,25% associada à adição de compostos como cloreto de benzalcônio 0,01%, EDTA, gentamicina 0,3%, oxybuprocaína 0,4% e trometamina para ajudar na penetração do epitélio íntegro. Modificações físico-químicas têm sido testadas através do peptídeo sintético (NC-1059) e nanotecnologia para facilitar a penetração da riboflavina.

3.4 Crosslinking acelerado

Muitos estudos foram realizados para reduzir o tempo total de reticulação.

Com base na lei de Bunsen-Roscoe (a mesma quantidade de energia total em diferentes momentos e intensidades de irradiação), é possível acelerar o processo de reticulação [21].

Os primeiros estudos publicados em 2011 avaliaram as mudanças biomecânicas na córnea com CXL acelerado comparando com o convencional [21].

Os resultados do CXL acelerado até 5 minutos com irradiância de 18 mW/cm^2 são satisfatórios [45], mas aumentar a irradiância acima de 40-50 mW/cm^2 pode diminuir a eficácia do procedimento [46]. Os diferentes tempos de irradiação UVA aplicados nos protocolos de CXL acelerado devem ser melhor estudados e padronizados visto que a resposta biológica também afeta o resultado do procedimento [46].

A linha de demarcação no CXL acelerado é mais superficial e menos evidente que no procedimento tradicional. O uso da linha de demarcação como evidência de efetividade do CXL é controverso, porém estudo recente não achou correlação da linha de demarcação com efetividade do CXL [47].

A diminuição do tempo de procedimento pode estar no uso de diferentes soluções de riboflavina que exigem menos tempo para penetrar na córnea. Refinamentos da técnica resultaram em diferentes tipos de riboflavinas, facilitando novos protocolos para o procedimento de reticulação. No entanto, uma melhor compreensão do comportamento de cada solução de riboflavina no tecido da córnea é essencial para a máxima segurança. A penetração de riboflavina em diferentes soluções pode afetar o tempo de saturação da córnea antes da aplicação da radiação e também mudar a hidratação da córnea alterando sua espessura.

3.5 Microscopia multifóton

A microscopia multifóton ou de fluorescência de dois fótons (TPF) possibilita a avaliação da penetração de riboflavina na córnea [22, 48]. Nesse método as moléculas absorvem mais de um fóton de cada vez, aumentando a capacidade de penetração do

laser. Nas técnicas convencionais, pode-se alcançar uma profundidade de 150-200 μm abaixo de sua superfície. Na espectroscopia multifóton a profundidade pode aumentar para mais de 700 μm.

Trata-se de técnica de microscopia óptica não linear, que usa uma fonte pulsada de femtosegundo (10^{-15} segundo) próximo ao infravermelho. A microscopia multifóton pode ser usada para captar imagens de fluorescência (autofluorescência de tecidos, células que expressam proteínas fluorescentes ou com agentes de contraste exógenos) e para a geração de imagens usando um fenômeno de propagação de alta ordem conhecido como SHG [25].

A microscopia multifóton apresenta como vantagens a confecção de imagens com grande profundidade, a captura de imagens sem o uso de fluoróforos ou agentes de contraste (captura autofluorescência do tecido) e mínimos danos causados pela luz de excitação que permite produzir imagens de alta resolução, incluindo estudos de observações longas.

No presente estudo, as córneas porcinas foram avaliadas com microscopia multifóton após a aplicação de dois tipos diferentes de soluções de riboflavina: dextran e hidroxipropilmetilcelulose.

4 Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de acordo com as diretrizes do Centro Nacional de Substituição, Refino e Redução de Animais em Pesquisa (NC3Rs), sob o Processo n. 1120/2018 (Anexo 8-A) .

4.2 Tipo de estudo e amostra

Foi realizado um estudo experimental com 20 córneas porcinas, entre outubro de 2018 e março de 2019.

4.3 Critérios de Inclusão

Foram incluídas no estudo córneas porcinas com menos de 10 horas a partir do momento da enucleação.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídas córneas com mais de 10 horas de enucleação, portadoras de alterações detectadas na transparência ou que apresentaram nos testes tonometria menor que 10 mmHg ou maior que 21 mmHg.

4.5 Soluções de riboflavina

A riboflavina utilizada no estudo possuía as seguintes caraterísticas:

- C.A.S.: 130-40-5.
- Fórmula: $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$.
- Peso molecular: 478.3
- pH 5,8.
- Rotação específica: + 41,6°.
- Perda por secagem: 7,7%.

Foram utilizadas dois tipos de soluções.

- Riboflavina 5 monofosfato a 0,1% (Eye Pharma, São Paulo, Brasil) em dextran a 20%. O dextran é um polissacarídeo biocompatível com elevado peso molecular.
- Riboflavina 5 monofosfato a 0,1% (Eye Pharma São Paulo) em HPMC a 1%. O HPMC é uma metilcelulose que foi modificada através de um tratamento com álcali e óxido de propileno, e por isso é considerada como uma modificação sintética de um polímero natural, a celulose.

4.6 Montagem da câmara artificial

Os discos corneoesclerais foram preparados em câmara anterior artificial (Barron Precision Instruments, Grand Blanc, MI, EUA) (Figura 1). Uma área de 8 mm foi marcada com trépano corneano e a desepitelização da córnea foi realizada com lâmina de bisturi número 15.

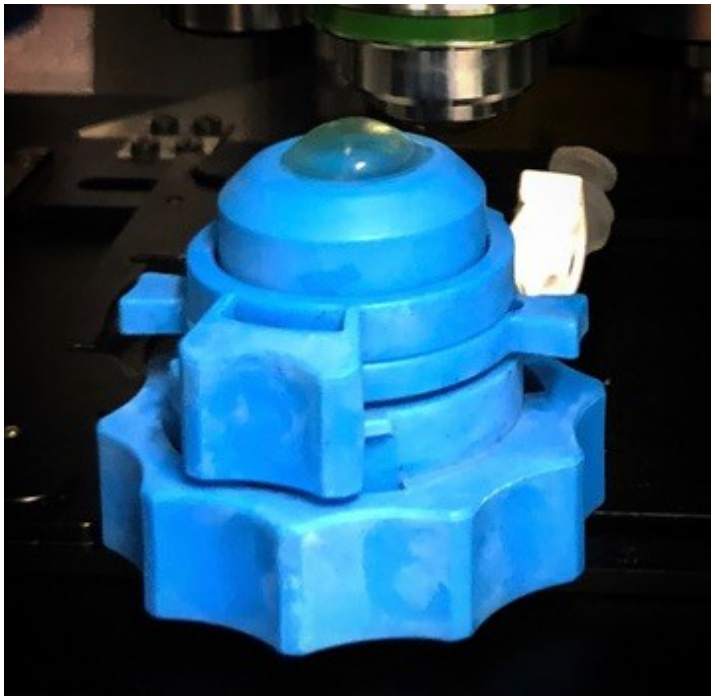

Figura 1 - Disco corneoescleral montado na câmara artificial

4.7 Deturgescência da córnea

A deturgescência das córneas foi feita pela aplicação de soluções correspondentes aos grupos de teste dentro da câmara artificial. No grupo dextran a

deturgescência das córneas foi realizada com Dextran T 500 a 20% (T500 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) que foi aplicado dentro da câmara anterior e em um reservatório sobre a córnea. A paquimetria ultrassônica (SP-100 Tomey, Nagoya, Japão) foi efetuada até que a estabilidade da espessura da córnea fosse alcançada (a variação máxima permitida foi de 5% em 3 medições consecutivas a cada 5 minutos). O grupo HPMC foi submetido aos mesmos passos, mas com solução de HPMC a 1% (Dow Portugal Chemicals, Estarreja, Portugal). Após a estabilidade da espessura da córnea a câmara artificial foi preenchida com solução salina balanceada (BSS).

A pressão foi medida usando um tonômetro portátil (Icare TA01i Finland Oy, Vantaa, Finlândia). Apenas as córneas porcinas que no decorrer do experimento mantiveram pressão entre 10–21 mmHg foram incluídas no estudo.

4.8 Aplicação de riboflavina

Durante a aplicação não foi utilizado reservatório sobre a córnea, ou seja, a riboflavina foi instilada sobre a córnea.

- Riboflavina 0,1% em 20% dextran foi instilada 1 gota a cada 3 minutos, durante 30 minutos.
- Riboflavina 0,1% em 1% HPMC foi instilada 1 gota de 3 em 3 minutos, durante 10 minutos.

A paquimetria ultrassônica foi realizada após o tempo total de instilação de riboflavina.

4.9 Microscópio multifóton

Os experimentos foram realizados no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica aplicada a Biologia Celular (INFABIC). A fluorescência de dois fótons foi capturada usando uma lente objetiva 20x por um microscópio multifóton (microscópio LSM 780; Zeiss, Oberkochen, Alemanha) que opera luz infravermelha pulsada gerando imagens através da excitação de fótons (Figura 2). Cada imagem foi registrada de 20 µm em 20 µm com área de imagem correspondente a 425,10 µm x 425,10 µm, até profundidade máxima estudada de 500 µm.

Figura 2 - Imagem do microscópio multifóton com todos seus módulos

A amostra fluorescente permite a reconstrução na terceira dimensão e esta é uma das principais vantagens deste método pois possibilita avaliar a profundidade de penetração da riboflavina. A emissão de laser foi ajustada para 900nm para evitar o segundo harmônica da riboflavina na córnea.

A espectrofotometria mostrou espectros de absorção e emissão de fluorescência de 5 monofosfato de riboflavina a 0,1%, um espectro de absorção bimodal com um pico mais alto a 445 nm.

As imagens foram capturadas antes do uso da riboflavina para calibrar os valores basais, após 10 minutos no grupo HPMC, após 30 minutos no grupo dextran e após 2 horas em cada grupo para determinar o valor das córneas saturadas. O filme de riboflavina no topo da córnea foi removido com esponja merocel antes de as imagens serem obtidas. A penetração da riboflavina foi avaliada pela intensidade de fluorescência (FI) detectada pelo microscópio multifóton (Figuras 3 e 4).

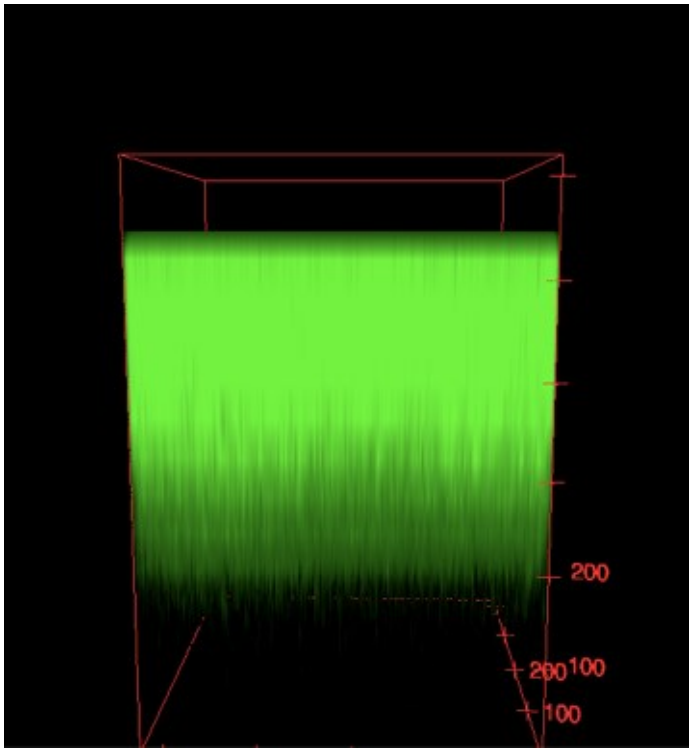

Figura 3 - Imagem 3D da córnea após saturação com riboflavina em HPMC. Imagem da microscopia multifóton processada com pacote de imagens Fiji. A intensidade de fluorescência é caracterizada pela cor verde. A riboflavina diminui com o aumento da profundidade

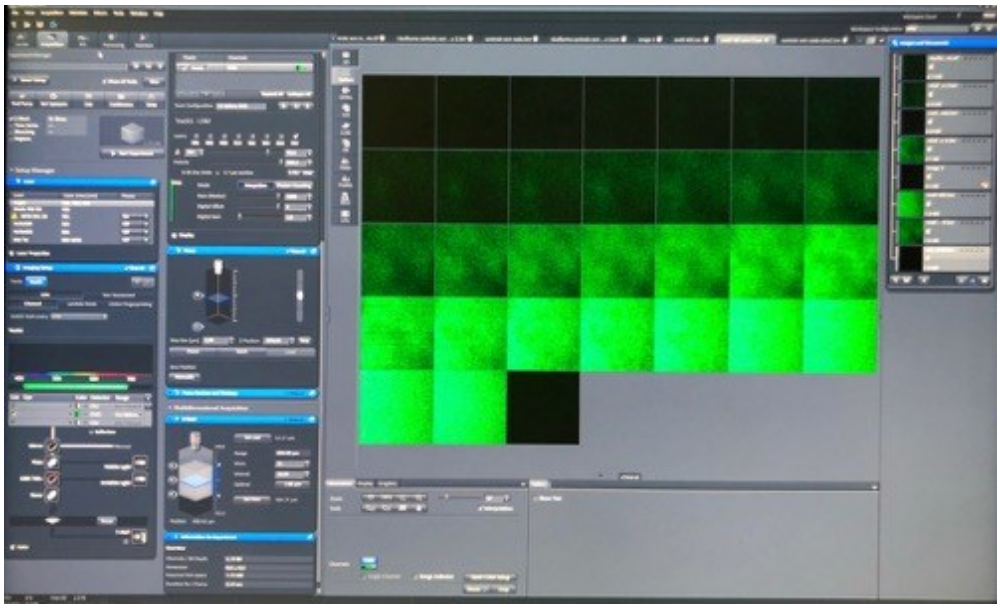

Figura 4 - Imagem da tela do microscópio multifóton mostrando cortes em profundidades diferentes da córnea. Observam-se inferiormente os cortes mais superficiais que apresentam maior FI da riboflavina. Com o aumento da profundidade a FI diminui progressivamente, o que pode ser verificado nos cortes mais superiores da tela

4.10 Determinação da concentração da riboflavina

A concentração de riboflavina foi determinada dividindo a FI em cada grupo pelos valores saturados das córneas do grupo correspondente e multiplicada pela concentração de riboflavina (0,1%). O processo de saturação é muito importante para corrigir os dados de absorção e espalhamento porque a fluorescência sofre dispersão e interferência pela matriz extracelular, ceratócitos e pela própria riboflavina [22].

4.11 Análise estatística

Dados numéricos foram extraídos das imagens do microscópio multifóton usando o pacote de processamento de imagens Fiji (https://fiji.sc/).

A análise estatística dos valores obtidos na microscopia multifóton foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney. Foram utilizados a planilha eletrônica MS-Excel, em sua versão do MS-Office 2013, para a organização dos dados, e o pacote estatístico IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 24.0, para a obtenção dos resultados e verificação de possível diferença entre as duas categorias. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 Resultados

5 RESULTADOS

O Ggráfico 1 mostra a FI no grupo HPMC por 10 minutos e após 2 horas com a córnea saturada. Em ambas as curvas, a fluorescência emitida pela riboflavina diminuiu com o aumento da profundidade da córnea e, também, houve maior penetração da riboflavina com o aumento do tempo. A FI foi definida como "1" unidade arbitrária (au).

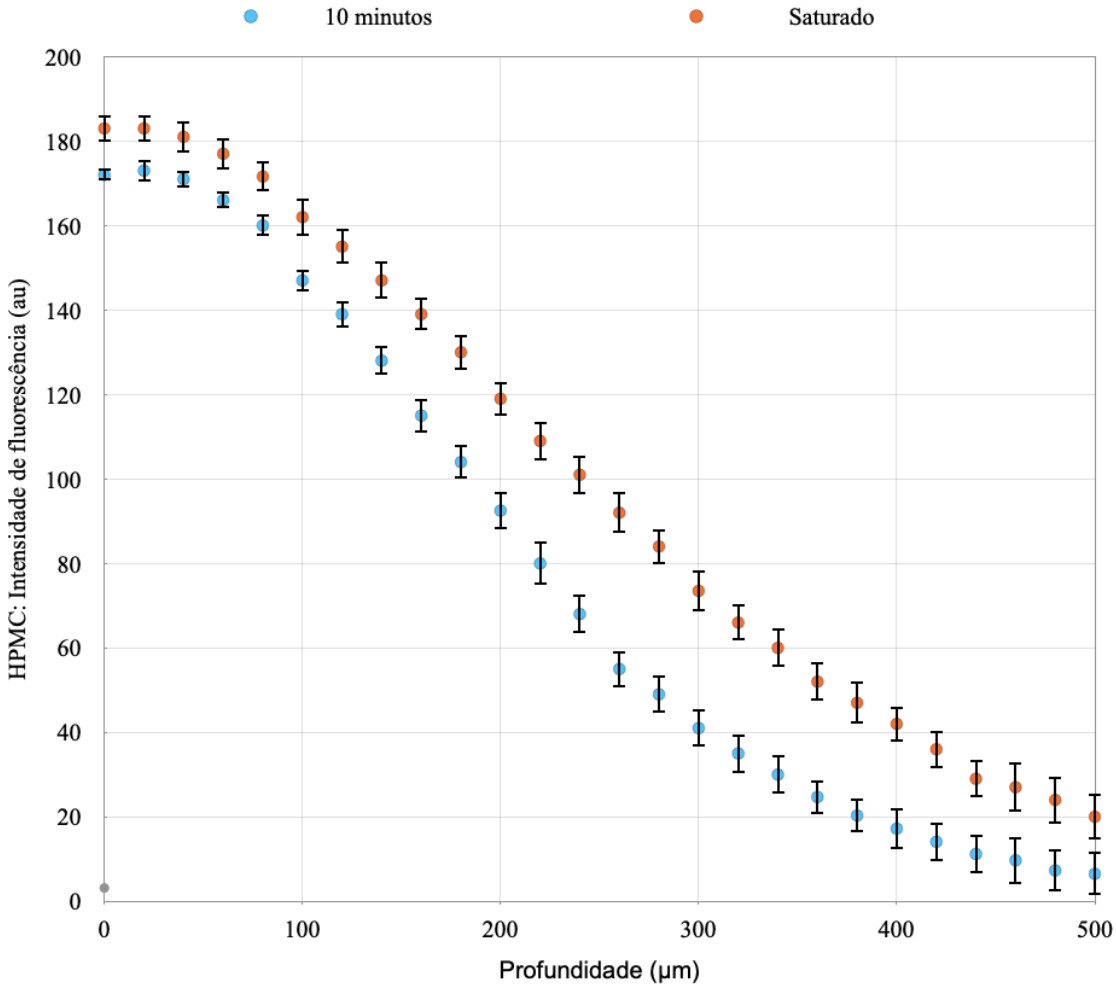

Gráfico 1 - FI no grupo HPMC por 10 minutos e após a saturação da córnea

O Gráfico 2 apresenta os resultados da FI no grupo dextran por microscopia multifóton realizada aos 30 minutos e após duas horas (córnea saturada). O comportamento das curvas é semelhante ao apresentado no grupo HPMC.

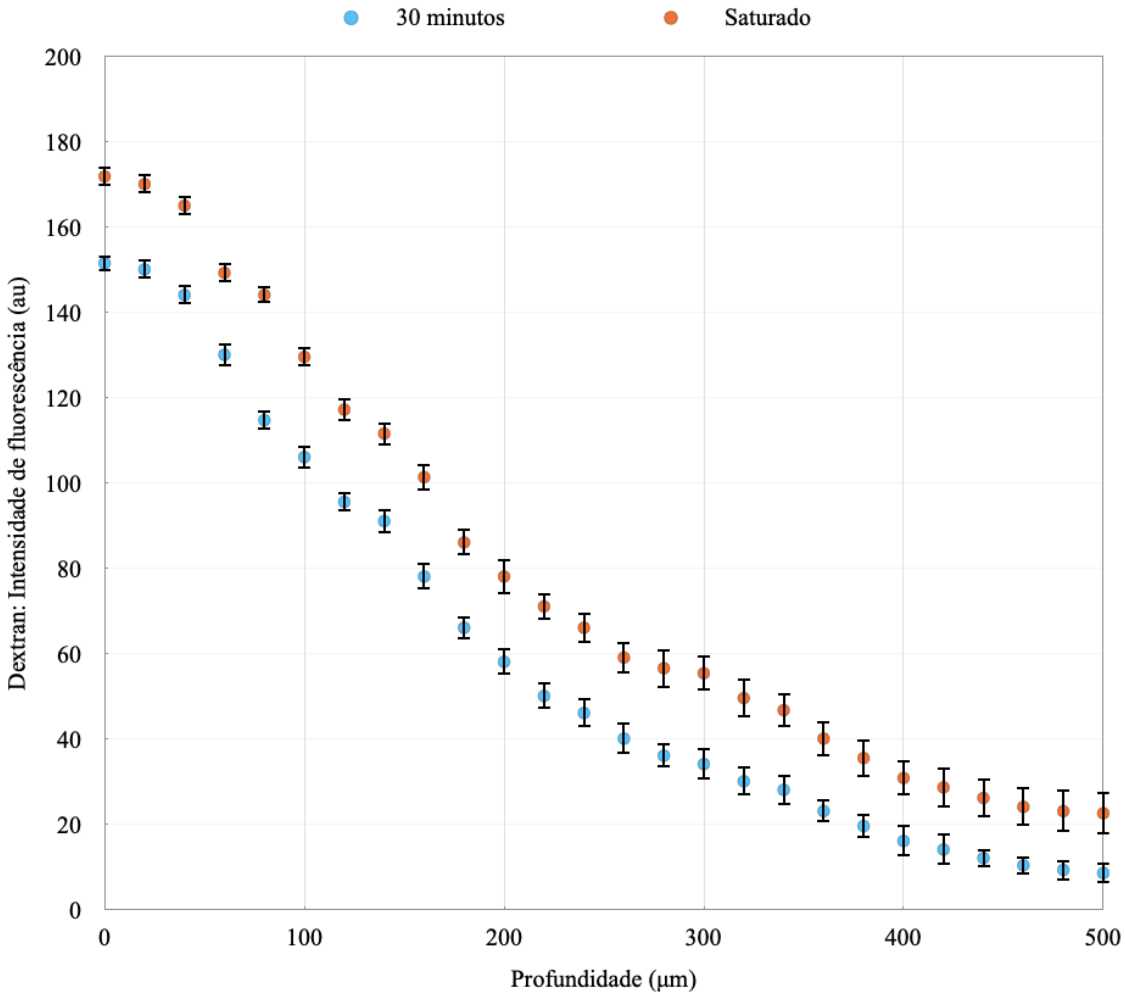

Gráfico 2 - FI no grupo de dextran por 30 minutos e após a saturação corneana

O Gráfico 3 mostra os valores de concentração de riboflavina na córnea obtidos por microscopia multifóton. A escala máxima do gráfico de concentração foi padronizada como 0,1% porque as soluções de riboflavina tinham a mesma concentração. Observe que os valores de concentração de ambas as curvas se cruzam a uma profundidade de aproximadamente 340 μm. Uma análise direta do gráfico aponta que as curvas mostram concentrações semelhantes em todas as profundidades, exceto entre 80 e 220 μm ($p = 0,012$). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos quando considerada toda a espessura corneana estudada ($p = 0,528$). A curva HPMC apresentou maior concentração até a profundidade de 340 μm, porém sem diferença estatisticamente significante ($p= 0,146$). A curva do grupo dextran em profundidades maiores que 340 μm foi maior que a do HPMC, mas também não houve significância estatística ($p= 0,248$).

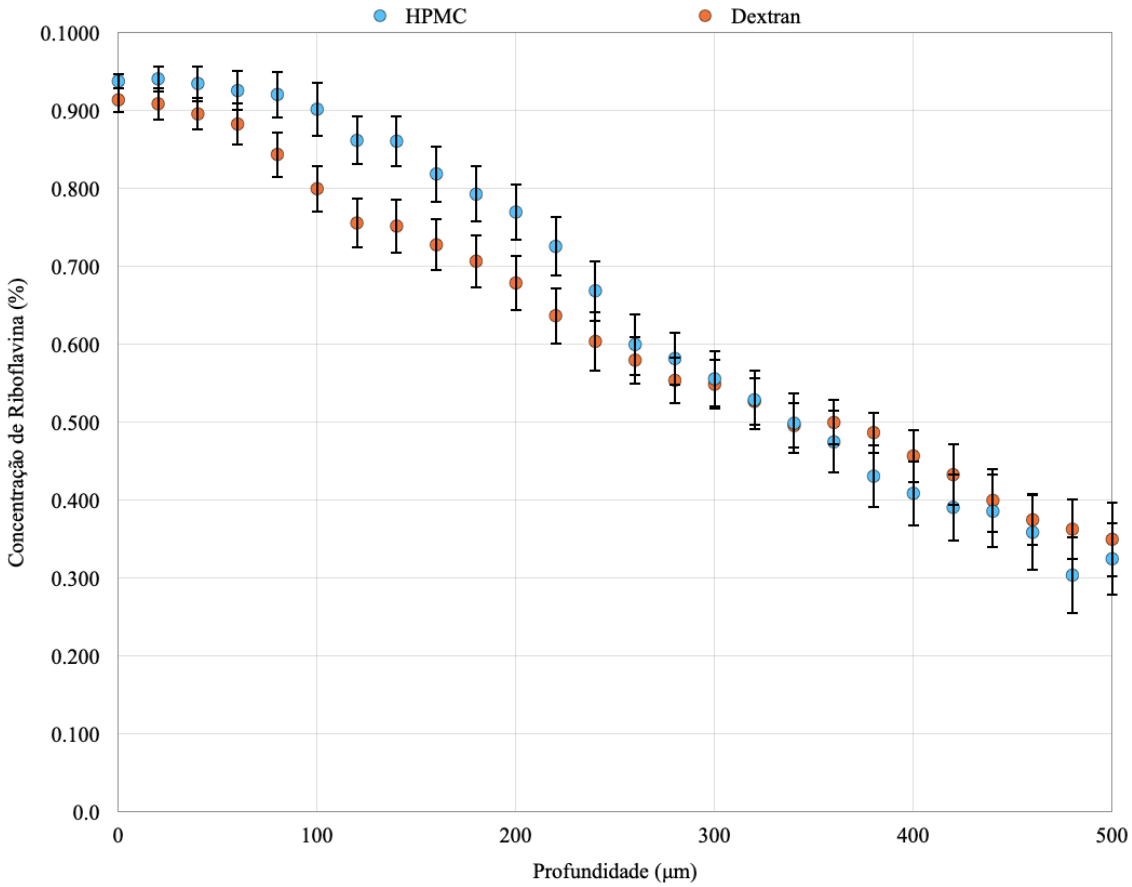

Gráfico 3 - Curvas de concentração de riboflavina nos grupos HPMC (azul) e dextran (laranja)

Para simular a concentração total de riboflavina nas córneas da superfície até a profundidade de 500 µm adotou-se o ajuste de curva linear (primeiro grau), cujas equações são mostradas no Gráfico 4, para estimar as duas áreas. Os ajustes das curvas lineares (R^2 = 0,9741 e 0,9997) são considerados bons porque os valores de R^2 são próximos de '1,0'.

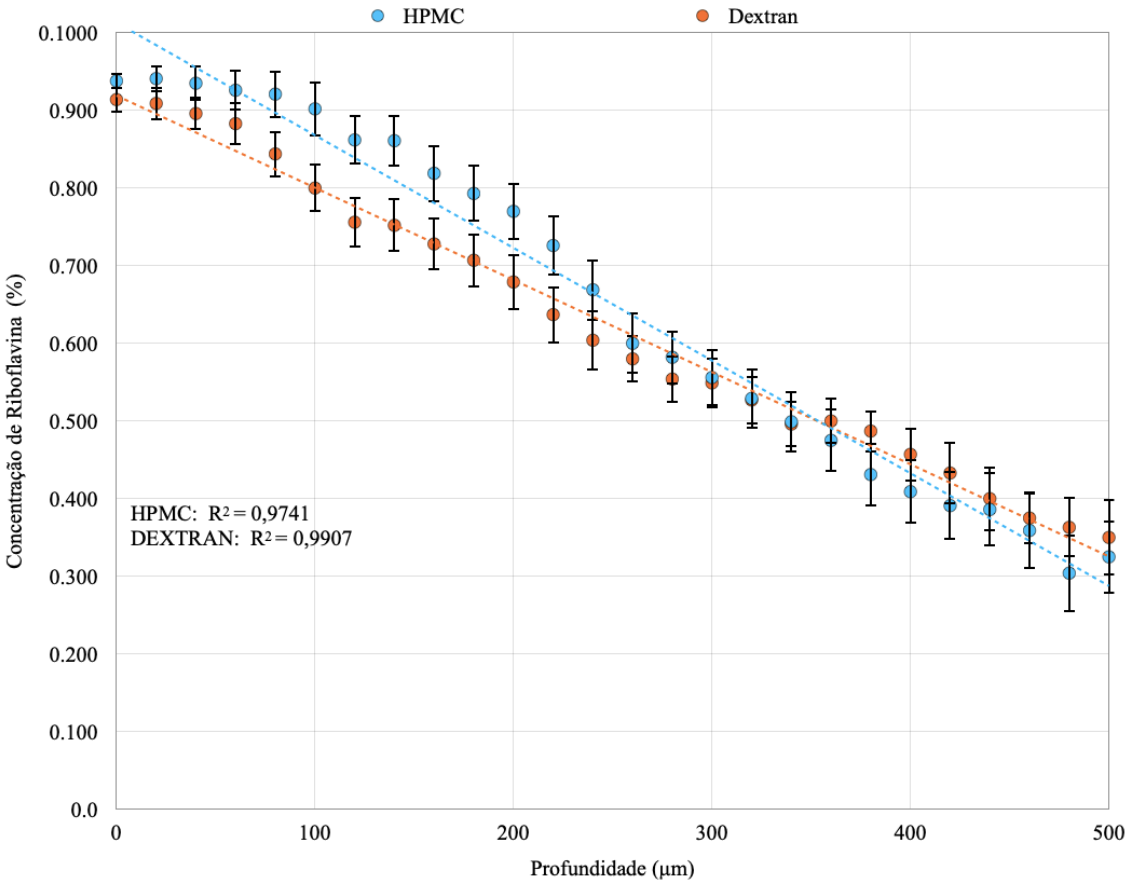

Gráfico 4 - Ajuste de curva linear: grupos HPMC (azul) e dextrano (laranja)

As áreas obtidas simulando a quantidade total de riboflavina na córnea foram muito semelhantes, como observado no Gráfico 5. Não há diferença significativa entre essas áreas. Portanto, as curvas são semelhantes indicando que os dois tipos de soluções estudadas penetraram em concentrações totais semelhantes nas córneas porcinas.

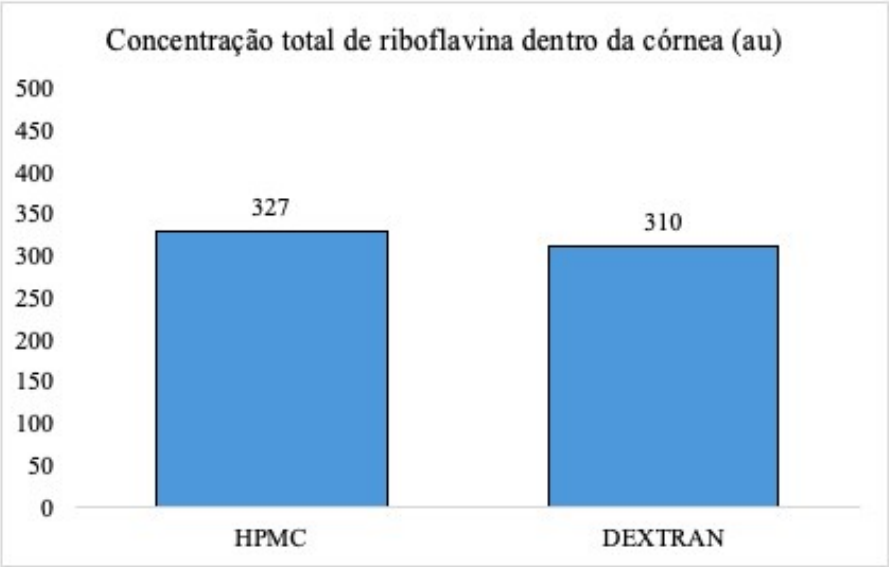

Gráfico 5 - Área correspondente à concentração total de riboflavina da córnea

A média das medidas de paquimetria ultrassônica central é mostrada na Tabela1. A paquimetria média no grupo dextran variou de 696 µm para 606 µm, causando uma diminuição na espessura da córnea de 12,9% em 30 min. No grupo HPMC, houve uma mudança de 684 µm para 746 µm em 10 min (um aumento de 9,1%).

Tabela 1 - Comparação da espessura média da córnea obtida por paquimetria ultrassônica central após a estabilização da córnea antes da aplicação de riboflavina (Antes) e após o uso de riboflavina dextran por 30 min e riboflavina HPMC por 10 min (Depois). (Média ± Erro Padrão)

Grupo	Antes (µm)	Depois (µm)	Variação
DEXTRAN 30 min	696 ± 15	606 ± 13	- 12.9 %
HPMC 10 min	684 ± 17	746 ± 11	+ 9.1 %

A tonometria realizada para estimar a pressão na câmara artificial estava dentro dos parâmetros considerados fisiológicos em todos os casos para os dois grupos, variando de 11 a 16 mmHg. A tonometria média obtida no grupo dextran foi de 15 mmHg e 13 no grupo HPMC.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A penetração da córnea pela riboflavina é um passo fundamental na proteção e eficácia do CXL atuando como um fotossensibilizador para a indução de reticulação além de proteger os tecidos subjacentes como um filtro da irradiação UVA. Uma melhor compreensão do comportamento de cada tipo de solução de riboflavina no tecido da córnea é essencial para maximizar a segurança.

O modelo utilizado neste estudo pode ser extrapolável para a córnea humana. Wollensak et al.[49] demonstraram que córneas humanas e porcinas apresentam comportamento semelhante em termos de mudança na estabilidade biomecânica após CXL corneano.

Este experimento difere de estudos anteriores porque simulamos condições fisiológicas usando mudanças metodológicas. Preenchemos a câmara artificial com solução salina balanceada (BSS), que apresenta características semelhantes às do humor aquoso, que já é amplamente utilizada em cirurgias oftalmológicas. O controle de pressão da câmara artificial foi muito importante pois grandes variações pressóricas poderiam influenciar o estado de hidratação da córnea e alterar a taxa de penetração de riboflavina no estroma. Além disso, pressões elevadas podem alterar os efeitos finais do CXL em córneas porcinas [50].

Nenhum reservatório foi usado sobre córnea durante o embebimento para simular as condições usadas durante a cirurgia de CXL. Outro fator também levado em consideração para não utilizar o reservatório foi o estudo [51] que descreveu a formação do filme sobre a córnea de riboflavina em dextran com 70 μm de espessura

e “break up time” (BUT) de 22 minutos, enquanto a riboflavina HPMC apresentou filme lacrimal de 300 μm de espessura e BUT de 32 minutos.

O estudo da penetração de riboflavina no estroma corneano foi relatado por vários grupos de pesquisas. Muitas variações técnicas recentes surgiram com base no protocolo de Dresden, incluindo variações no tempo de irradiação [52], no tipo de riboflavina, sem desepitelização da córnea, uso de iontoforese [53] e tratamentos personalizados [54]. Os protocolos atuais são promissores, mas é necessário estudar o comportamento de cada solução de riboflavina no estroma corneano para padronizar condutas e comparar resultados. Um estudo anterior [22] usou dextran 20% T500 dentro de uma câmara artificial durante o embebimento da córnea. No presente estudo após o estabelecimento da estabilidade de hidratação da córnea preencheu-se com BSS a câmara artificial procurando-se aproximar-se o máximo possível das condições clínicas.

A concentração de riboflavina corneana no grupo dextran 20% por 30 minutos foi considerada como efetiva no procedimento de CXL por ter sido extensivamente estudada. Absorções menores podem afetar a segurança.

A difusão da riboflavina segue a segunda lei de Fick. A difusão da riboflavina é independente do agente osmótico porque a pressão parcial da riboflavina provavelmente representa a força motriz da difusão.

A curva FI formada pelo grupo dextran apresentou um comportamento ligeiramente diferente das curvas de difusão padrão, o que pode ser explicado pela variação nas propriedades ópticas do dextran [55] que pode ser causada pela variação de temperatura durante a realização do TPF.

Os resultados deste estudo mostraram que as curvas de concentração dos grupos dextran 30 minutos e HPMC 10 minutos. tiveram comportamentos semelhantes ao longo da espessura da córnea estudada (p= 0,528). Estes dados mostram que o embebimento com HPMC em 10 minutos tem a mesma eficácia que o dextran em 30 minutos. As curvas se cruzam aproximadamente na profundidade de 340 µm. O grupo HPMC apresentou maior concentração nas camadas superficiais, mas ao considerar a faixa de 0 a 340 µm não houve diferença estatística entre os grupos (p= 0,146). Observamos uma concentração maior de dextran de 340 µm a 500 µm, mas sem diferença estatisticamente significante (p= 0,248).

A similaridade das curvas pode ser confirmada pela análise complementar ajustando as curvas pelas linhas de tendência. As áreas formadas pelas curvas também evidenciadas pelo gradiente total de concentração de riboflavina nas córneas estudadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

A maioria dos estudos com HPMC tem uma concentração de 1,1%. Este estudo foi feito com riboflavina HPMC na concentração de 1%.

Ehmke et al.[22] não encontraram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de riboflavina (1% de HPMC e 20% de dextran) de zero a 350 µm, mas relataram uma maior concentração de riboflavina dextran nos primeiros 70 µm. Esses resultados diferem dos encontrados neste estudo, mas é possível que essa diferença tenha resultado de diferenças na metodologia utilizada e na concentração diferente de HPMC.

O uso de riboflavina HPMC permitiu um tempo de procedimento mais curto do que o protocolo de Dresden. Assim, os resultados do presente estudo favorecem a tendência atual de diminuir o tempo total cirúrgico do CXL corneano.

Alguns autores demonstraram a influência de diferentes soluções de riboflavina na espessura da córnea durante o tempo de saturação [56, 57]. As medidas de espessura da córnea variaram após o uso da riboflavina, e o grupo dextran apresentou diminuição de 12,9% na espessura após 30 min. Esse resultado tem grande importância no uso clínico, pois córneas com espessura próxima a 400 μm podem comprometer a segurança do procedimento. A redução na espessura da córnea pode ser explicada pelo efeito oncótico da solução de dextran a 20%. O grupo HPMC apresentou um aumento de 9,1% na espessura da córnea após 10 min. Um estudo anterior relatou uma diminuição na espessura da córnea de 12,1% com riboflavina dextrana (30 min) e um aumento de 26,1% na paquimetria com 1,1% de riboflavina HPMC (por 20 minutos) [56]. O tempo de saturação da riboflavina na HPMC por 20 minutos no estudo citado acima pode ser a causa do aumento mais significativo na espessura da córnea quando comparado ao nosso estudo. Kymionis et al.[57] relataram uma redução de 20% na espessura usando riboflavina dextran em 30 minutos.

Uma limitação do presente estudo está relacionada ao estado de hidratação das córneas mesmo utilizando córneas com menos de 10 horas após enucleação e também fazer a deturgescência delas. As medidas paquimétricas mostraram córneas com espessuras aumentadas, consequentemente, um menor conteúdo de colágeno por volume pode influenciar o gradiente de difusão. A hidratação da córnea tem grande importância na penetração da riboflavina, pois quanto mais compactas as fibras, maior a dificuldade de absorção da riboflavina.

A concentração das duas soluções é semelhante até 500 μm. Avaliando a profundidade de 340 μm que as curvas se cruzam, observamos que a profundidade

corresponde às condições fisiológicas de hidratação em aproximadamente 310 μm no grupo HPMC (aumento de 9,1%) e 395 μm no grupo dextran (queda de 12,9%).

O controle da pressão dentro de valores considerados normais na câmara artificial utilizando o tonômetro Icare simulou condições fisiológicas e reduziu variáveis que poderiam interferir na penetração da riboflavina.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

- A pesquisa evidenciou que a concentração corneana de riboflavina foi semelhante nos dois grupos (instilação de 1 gota de riboflavina a 0,1% em HPMC a 1% a cada 3 minutos por 10 minutos versus 1 gota de riboflavina 0,1% em 20% dextran foi instilada a cada 3 minutos por 30 minutos). A riboflavina em HPMC apresentou o mesmo nível de segurança e eficácia na saturação da córnea quando comparadas ao uso padronizado recomendado pelo protocolo de Dresden, pois penetrou mais rápido e com mais facilidade no estroma corneano.
- A aferição da espessura central das córneas pela paquimetria ultrassônica central durante o procedimento de CXL mostrou variação de -12,9% no grupo riboflavina 0,1% em 20% dextran (de 696 μm para 606 μm) e de +9,1% no grupo de riboflavina a 0,1% em HPMC a 1% (de 684 μm a 756 μm).
- A aferição da pressão na câmara anterior mostrou tonometria média de 15 mmHg no grupo riboflavina 0,1% em 20% dextran e 13 mmHg no grupo riboflavina a 0,1% em HPMC a 1%.
- O estudo reforça a hipótese de que o embebimento da córnea com riboflavina a 0,1% em HPMC 1% por 10 minutos é seguro e pode contribuir para dimuir o tempo total do CXL corneano.
- Estudos clínicos devem ser feitos para comprovar essa hipótese.

8 Anexos

Anexo A. Aprovação da Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **"Análise comparativa com Microscopia Multifoton da penetração da riboflavina em córneas porcinas através de duas diferentes apresentações: Riboflavina em dextran e Riboflavina em metilcelulose"**, registrada com o **nº 1120/2018**, sob a responsabilidade de **Milton Ruiz Alves** e **THALES ANTONIO ABRA DE PAULA,** apresentada pelo Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 18.07.18

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 06-08-2018 Término: 03-06-2019
Espécie/linhagem/raça	suínos
Nº de animais	**20 córneas suínas de frigorífico**
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Abatedouro Raja

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 18 de Julho de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

9 Referências

9 REFERÊNCIAS

1. Duke-Elder S, Leigh AG. Keratoconus: conical cornea. In: Duke-Elder S. System of ophthalmology. London: Henry Kimpton; 1965. v. 8. p.964-76.

2. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related non-inflammatory corneal thinning disorders. Surv Ophthalmol. 1984;28:293-322.

3. Rabinowitz YS. Keratoconus. Surv Ophthalmol. 1998;42(4):297-319.

4. Lawless M, Coster DJ, Phillips AJ, Loane M. Keratoconus: diagnosis and management. Aust N Z Ophthalmol. 1989;17(1):33-60.

5. Copeman PW. Eczema and keratoconus. Br Med J. 1965;5468:977-9.

6. Wachtmeister L, Ingemansson SO, Moller E. Atopy and HLA antigens n patients with keratoconus. Acta Ophthalmol (Copenh). 1982;60:113-22.

7. Shapiro M, France TD. The ocular features of Down's syndrome Am J Ophthalmol 1985;99(6): 659-63.

8. Tan JCK, Nguyen V, Fenwick E, Ferdi A, Dinh A, Watson SL. Vision-related quality of life in keratoconus: A Save Sight Keratoconus Registry Study. Cornea. 2019;38(5):600-4.

9. Sykakis E, Carley F, Irion L, Denton J, Hillarby MC. An in depth analysis of histopathological characteristics found in keratoconus. *Pathology*. 2012;44(3):234-239.

10. Shetty R, Kaweri L, Pahuja N,Nagaraja H, Wadia K, Jayadev C, Nuijts R, Arora V. Current review and a simplified "Five-Point Management Algorithm" for keratoconus. Indian J Ophthalmol. 2015;63(1):46-53.

11. Ashwin PT, McDonnell PJ. Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. Br J Ophthalmol. 2010;94(8):965-70.

12. Hafezi F, Kanellopoulos J, Wiltfang R, Seiler T. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis. J Cataract Refract Surg. 2007;33(12):2035-40.

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

14. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. Curr Eye Res. 2004;29:35-40.

15. Wollensak G, Spoerl E, Rebel F, Pillunat L, Funk R. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. Ophthalmic Res. 2003;35:324-8.

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

17. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. Exp Eye Res. 1998;66(1):97-103.

18. Kohlhaas M, Spoerl E, Speck A, Schilde T, Sandner D, Pillunat LE. A new treatment of keratectasia after LASIK with riboflavin/UVA light cross-linking. Klin Monatsbl Augenheilkd. 2005;222(5):430-6.

19. Coskunseven E, Jankov 2nd MR, Hafezi F. Contralateral eye study of corneal collagen cross0linking with riboflavin and UVA irradiation in patients with keratoconus. J Refract Surg. 2009;25(4):371-6.

20. Vinciguerra P, Albé E, Trazza S, Rosetta P, Vinciguerra R, Seiler T, Epstein D. Refractive, topographic, tomographic, and aberrometric analysis of keratoconic eyes undergoing corneal cross-linking. Ophthalmology. 2009;116(3):369-78.

21. Schumacher S, Oeftier L, Mrochen M. Equivalence of biomechanical changes induced by rapid and standard corneal cross-linking, using riboflavin and ultraviolet radiation. Invest Ophthalmol. Vis Sci. 2011;52(12):9048-52.

22. Ehmke T, Seiler TG, Fischinger I, Ripken T, Heisterkamp A, Frueh BE. Comparison of corneal riboflavin gradients using dextran and HPMC solutions. J Refract Surg. 2016 1;32(12):798-802.

23. Seiler TG, Ehmke T, Fischinger I, Zapp D, Stachs O, Seiler T, Heisterkamp A. Two-photon fluorescence microscopy for determination of the riboflavin concentration in the anterior corneal stroma when using the Dresden Protocol. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56(11):6740-6.

24. Gore DM, Margineanu A, French P, O'Brart D, Dunsby C, Allam BD. Two-photon fluorescence microscopy of corneal riboflavin absorption. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55(4):2476-81.

25. Shen YR. Optical second harmonic generation at interfaces. Annu Rev Phhys. Chem. 1989;40:327-50.

26. 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.

27. Toprak I, Yildirim C. Effects of corneal collagen crosslinking on corneal topographic indices in patients with keratoconus. Eye Contact Lens. 2013;39:385-7.

28. Ghanem R, Santhiago M, Berti T,Netto MV, Ghanem VC. Topographic, corneal wavefront, and refractive outcomes 2 years after collagen crosslinking for progressive keratoconus. Cornea. 2014;33(1):43-8.

29. Salgado J, Khoramnia R, Lohmann C, von Mohrenfels CW. Corneal collagen crosslinking in post-LASIK keratectasia. Br J Ophthalmol. 2011;95(4):493-7.

30. Wittig-Silva C, Chan E, Islam F, Wu T, Whiting M, Snibson GR. A randomized, controlled trial of corneal collagen crosslinking in progressive keratoconus: three-year results. Ophthalmology. 2014;121(4):812-21.

31. Hashemi H, Seyedian M, Miraftab M, Fotouhi A, Asgari S. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet an irradiation for keratoconus: long-term results. Ophthalmology. 2013;120(8):1515-20.

32. Galvis V, Tello A, Ortiz AI, Escaf LC. Patient selection for corneal collagen crosslinking: an updated review. Clin Ophthalmol. 2017;11:657-68.

33. 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.

34. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. Curr Opin Ophthalmol. 2006;17(4):356-60.

35. 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.

36. Santiago MR. Cross-linking da córnea: protocolo padrão. Rev Bras Oftalmol. 2017;76(1):43-9.

37. Leoni-Mesplie S, Mortemousque B, Touboul D, Malet F, Praud D, Mesplié N, Colin J. Stalability and severity of keratoconus in children. Am J Ophthalmol. 2012;154(1):56-62.

38. Vinciguerra P, Albe E, Frueh BE, Trazza S, Epstein D. Two-year corneal cross-linking results in patients younger than 18 years with documented progressive keratoconus. Am J Ophthalmol. 2012;154(3):520-6.

39. Raiskup F, Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. Clinical indications and results. Ocul Surf. 2013;11(2):93-108.

40. Diffey BL Sources and measurement of ultraviolet radiation. Methods. 2002;28(1):4-13.

41. Yossef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity. Eye. 2011;25(1):1-14.

42. Lucas R, McMichael T, Smith W, et al. Solar ultraviolet radiation. Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. Disponível em: https://www.who.int/uv/health/solaruvrad.pdf. Acessado em 05/02/2019.

43. Edwards AM. Structure and general properties of flavins. Methods Mol Biol. 2014;1146:3-13.

44. Souza ACS, Ferreira CV, Jucá MB, et al. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. Quim Nova. 2005;28(5):887-91.

45. Shetty R, Pahuja NK, Nuijts RMMA, Ajajni A, Jayadev C, Sharma C, Nagaraja H. Current protocols of corneal collagen cross-linking: visual, refractive, and tomographic outcomes. Am J Ophthalmol. 2015;160(2):243-9.

46. Wernli J, Schumacher S, Spoerl E, Mrochen M. The efficacy of corneal cross-linking shows a sudden decrease with very high intensity UV light and short treatment time. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(2):1176-80.

47. Mesen A, Bozkurt B, Kamis U, Okudan S. Correlation of demarcation line depth with medium-term efficacy of different corneal collagen cross-linking protocols in keratoconus. Cornea. 2018; 37(12):1511-6.

48. Gore DM, Margineanu A, French P, O'Brart D, Dunsby C, Allan BD. Two-photon fluorescence microscopy of corneal riboflavin absorption. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55(4):2476-81.

49. 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.

50. McQuaid R, Li J, Cummings A, Mrochen M, Vohnsen B. Second-harmonic reflection imaging of normal and accelerated corneal crosslinking using porcine corneas and the role of intraocular pressure. Cornea. 2014;33(2):125-30.

51. Wollensak G, Aurich H, Wiberlauer C, Sel S. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking. J Cataract Refract Surg. 2010;36(1):114-20.

52. Ozgurhan EB, Akcay BI, Kurt T, Yildririm Y, Demirok A. Accelerated corneal collagen cross-linking in thin keratoconic corneas. J Refract Surg. 2015;31(6):386-90.

53. Jouve L, Borderie V, Sandali O, Temstet C, Basli E, Laroche L, Bouheraoua N. Conventional and iontophoresis corneal cross-linking for keratoconus: Efficacy and assessment by optical coherence tomography and confocal microscopy. Cornea. 2017;36(2):153-62.

54. Cassagne M, Pierné K, Galiacy SD, Asfaux-Marfaing M-P. Fournié P, Malecaze F. Customized topography-guided corneal collagen cross-linking for keratoconus. J Refract Surg. 2017;33(5):290-7.

55. Xu X, Wang RK, Elder JB, Tuchin VV. Effect of dextran-induced changes in refractive index and aggregation on optical properties of whole blood. Phys Med Biol. 2003;48(9):1205-21.

56. Zaheer N, Khan WA, Khan S, Khan MAM. Comparison of changes in central corneal thickness during corneal collagen cross-linking, using isotonic riboflavin

solutions with and without dextran, in the treatment of progressive keratoconus. Cornea. 2018;37(3):340-6.

57. Kymionis GD, Kounis GA, Portaliou DM, Grentzelos MA, Karavitaki AE, Coskunseven E, Jankov MR, Pallikaris IG. Intraoperative pachymetric measurements during corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet A irradiation. Ophthalmology. 2009;116(12):2336-9.

10 Apêndices

Apêndice 1

Clinical Ophthalmology

Dovepress
open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

Comparative Two-Photon Fluorescence Microscopy Analysis of Riboflavin Penetration in Two Different Solutions: Dextran and Hydroxypropyl Methylcellulose

This article was published in the following Dove Press journal:
Clinical Ophthalmology

Thales Antonio Abra De Paula
Fernando Betty Cresta
Milton Ruiz Alves

University of São Paulo USP, Ophthalmology, Medical School, São Paulo, Brazil

Purpose: This study compared riboflavin penetration in porcine corneas using two different solutions: dextran and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC).
Methods: Porcine corneas were de-swollen and after prepared in an artificial anterior chamber with balanced saline solution. The pressure was checked with a portable tonometer. We used 0.1% riboflavin in 20% dextran for 30 min or 0.1% riboflavin in 1% HPMC for 10 min. The fluorescence intensity in multiphoton microscopy was used to evaluate concentration into the cornea, and ultrasonic pachymetry was performed before and after using riboflavin.
Results: Riboflavin concentration up to 340 µm was higher in the HPMC group (p 0.146). From 340 microns to 500 µm, the concentration was higher in the dextran group (p 0.248). There was no statistically significant difference between the groups when considering all the corneal thickness studied (p 0.528). Pachymetric measurements in the group with dextran showed a 12.9% corneal thickness decrease after 30 min, while the HPMC group showed a 9.1% increase after 10 min.
Conclusion: We concluded that 1% HPMC riboflavin for 10 min had the same level of safety when compared to the Dresden protocol with dextran riboflavin for 30 min. Ultrasonic pachymetry during corneal crosslinking has fundamental importance in controlling corneal hydration due to changes in thickness caused by different types of riboflavin. This study used different methods than previous studies to better simulate corneal physiological conditions and used 1% HPMC concentration which differs from previous studies performed with 1.1% HPMC.
Keywords: crosslinking, fluorescence, riboflavin

Introduction

Corneal collagen crosslinking is used to treat the progression of corneal ectasia diseases (e.g., keratoconus, pellucid marginal degeneration, and keratoglobus, and after refractive surgery), infections, and corneal edema.[1] Crosslinking consists of forming bonds between polymer chains to produce a more rigid three-dimensional structure. Corneal polymeric crosslinking occurs in the presence of UVA (370 nm) radiation, and riboflavin, which acts as a photoinducer of the reaction.[2] The minimum pachymetry for the procedure is 400 µm,[3–5] which allows an acceptable level of safety when considering the wavelength and the

Correspondence: Thales Antonio Abra De Paula
Rua Apeninos 800,apt 1004,São Paulo, SP 04104-020, Brasil
Email thalesaap@hotmail.com

© 2020 De Paula et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at http://www.dovepress.com/terms.php and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v4.0) License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial use of the work is permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (http://www.dovepress.com/terms.php).

time of UVA exposure. Seiler et al[6] reported an experimental study of pig eye corneas in 1997, marking the beginning of corneal crosslinking. Since that study, some technical variations have resulted in greater safety and effectiveness of the procedure, whose primary objective of corneal crosslinking is to inhibit the progression of corneal ectasias.[6–9]

The first clinical study using corneal ectasia (Dresden protocol) was published in 2003 by Wollensak et al.[10] It showed that crosslinking of corneal collagen was an effective procedure to stop the progression of keratoconus. The Dresden protocol use of 0.1% riboflavin in 20% dextran in de-epithelialized corneas for 30 min, with irradiation with UVA (370 nm) at 3 mW/cm^2 for 30 min, for a total dose of 5.4 J/cm^2. The results are effective in stopping the progression of corneal ectasias. Most studies and current knowledge of corneal crosslinking involve this protocol.

Riboflavin (vitamin B2) is a photosensitive agent that produces free radicals in the presence of light and oxygen. Free radicals (reactive oxygen species) induce covalent bonds between collagen fibers and/or proteoglycans. Another essential function of riboflavin in this procedure is its use as a filter, protecting structures such as crystalline lens, the retina, and the corneal endothelium. Riboflavin penetration is therefore a key step in corneal protection during this procedure.

Many studies have been performed to reduce the total time of crosslinking. Based on the Bunsen-Roscoe law (the same amount of total energy at different times and irradiation intensities), it is possible to accelerate the crosslinking process.[11] Recent studies have determined a shorter procedure time, using different riboflavin solutions requiring less time to penetrate the cornea.

Refinements of the technique have resulted in different types of riboflavin, facilitating new protocols for the crosslinking procedure. However, a better understanding of the behavior of each type of riboflavin in corneal tissue is essential to increase safety. Riboflavin penetration in different solutions can affect the safety and saturation time before the application of radiation because it can affect the thickness of the cornea.

Two-photon fluorescence microscopy (TPF) makes it possible to evaluate riboflavin penetration in the cornea.[12–14] It is a nonlinear optical microscopy technique, which uses a near-infrared femtosecond pulsed source. It can be used for fluorescence imaging (autofluorescence of tissues, cells expressing fluorescent proteins, or with exogenous contrast agents) and for imaging using a high order spreading phenomenon known as Second Harmonic Generation.

In the present study, porcine corneas were evaluated with multiphoton microscopy after the application of two different types of riboflavin solutions: dextran and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). To compare the riboflavin penetration in different solutions (dextran and HPMC) in porcine corneas, this study used multiphoton microscopy to improve the assessment of corneal soaking in crosslinking.

Materials and Methods

The research started with the approval of the Animal Use Ethics Committee of the University of São Paulo, Medical School, São Paulo, Brazil, which approved the proper and ethical use of laboratory animals using the guidelines of the National Center for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs).

Two groups were created with 10 porcine corneas in each group. The test was performed within 10 h of pig eye enucleation to improve corneal conditions. The corneoscleral discs were prepared in an artificial anterior chamber[13] (Barron Precision Instruments, Grand Blanc, MI, USA). An 8-mm area was marked with a corneal trephine and corneal de-epithelialization was performed with a number 15 scalpel blade. The dextran group had the corneas de-swollen with Dextran T 500 20% (T500 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) applied inside the anterior chamber and in a reservoir on the cornea. Ultrasonic pachymetry (SP-100 Tomey, Nagoya, Japan) was performed after assembly and de-epithelialization, until corneal thickness stability was achieved (the maximum allowable variation was 5% in 3 consecutive measurements every 5 minutes). HPMC group underwent the same steps but the de-swollen was made with 1% HPMC (Dow Portugal Chemicals, Estarreja, Portugal) solution. After the de-swollen, the artificial chamber was filled with balanced saline solution (BSS) inside the artificial chamber.

The pressure was measured using a portable tonometer (Icare TA01i Finland Oy, Vantaa, Finland). Only cases with pressures throughout the procedure between 10–21 mmHg were included in the study.

Riboflavin monophosphate (0.1%) in 20% dextran and 0.1% riboflavin monophosphate in 1% HPMC were used the following protocols: riboflavin drops (according to the test group) were instilled every 3 min. Soaking time was 30 min in the dextran group and 10 min in the HPMC group. During soaking the reservoir was not used on the

cornea. Pachymetry was also performed after the total time of riboflavin application.

TPF were captured using a 20x objective lens by a multiphoton microscope (LSM 780 microscope; Zeiss, Oberkochen, Germany) which operates pulsed infrared laser light generating images through the excitation of photons. Each image was recorded on z-stacks ranging from 20 µm over a depth of 500 µm with image area 425.10 x 425.10 µm.

Multiphoton microscopy has the advantage of third-dimensional image capture and enables better sample analysis. Laser emission was set to 900 nm to avoid cornea second harmonic generation. The images were captured before riboflavin use to calibrate the baseline values, after 10 min in the HPMC group and 30 min in the dextran group and after 2 hours in each group to determine the value of the saturated corneas. The riboflavin film on the top of the cornea was removed with Merocel sponge before images were obtained. Riboflavin penetration was evaluated by the fluorescence intensity (FI) detected by the multiphoton microscope (Figure 1).

The riboflavin concentration was determined by dividing FI in each group by the saturated corneal values of the correspondent group and multiplied by the riboflavin concentration (0.1%). The saturation process is very important to correct absorption and scattering data because fluorescence undergoes scattering and interference by extracellular matrix, keratocytes and by riboflavin itself.[13]

Numerical data were extracted from the images using the Fiji image processing package (https://fiji.sc/).

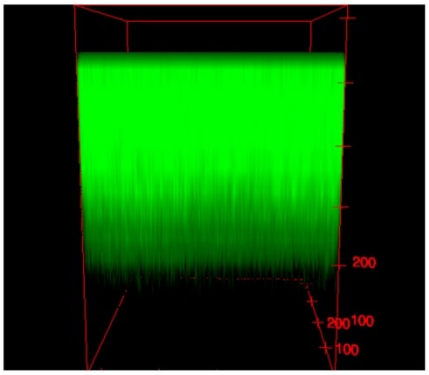

Figure 1 Corneal 3D image after soaking. Multiphoton microscopy processing with Fiji image package. Fluorescence intensity is characterized by the green color. The riboflavin decreased with increasing corneal depth.

Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test with statistical package IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Figure 2 shows FI in the HPMC group for 10 minutes and after corneal saturation. In both curves, the riboflavin concentration decreased with increasing corneal depths and increased riboflavin penetration with increasing time. FI was defined as "1" arbitrary unit (au).

Figure 3 presents the Dextran group results by multiphoton microscopy performed at 30 minutes and two hours (saturated). The curves' behavior is similar to that presented in the HPMC group.

Figure 4 shows riboflavin concentration in the cornea obtained from multiphoton microscopy. The maximum scale of the concentration graph was standardized as 0.1% because the riboflavin solutions had the same concentration. Note that the concentration values of both curves cross at a depth of approximately 340 µm. A direct analysis of the graph shows that the curves have similar concentrations at all depths except in the range between 80 and 220 µm (p 0.012). The HPMC curve showed higher surface concentration up to 340 µm (p 0.146). The dextran curve at depths greater than 340 µm was higher (p 0.248). There was no statistically significant difference between the groups when considering all the corneal thickness studied (p 0.528).

To simulate the total concentration up to 500 microns we adopted the linear (first degree) curve fitting, whose equations are shown in Figure 5, to estimate both areas. The adjustments of the linear curves (R2 = 0.9741 and 0.9907) are considered good because the R2 values are quite close to "1.0".

The areas obtained simulating the total amount of riboflavin in the cornea were very similar as we observed in Figure 6. There is no significant difference between these areas. Therefore, the curves are similar.

The average of the central ultrasound pachymetric measurements is shown in Table 1. The mean pachymetry in the dextran group ranged from 696 µm to 606 µm, causing a decrease in corneal thickness of 12.9% in 30 min. In the HPMC group, there was a change from 684 µm to 746 µm in 10 min (an increase of 9.1%).

The tonometry performed in the artificial chamber was within parameters considered physiological in all cases for the two groups, ranging from 11 to 16 mmHg. The mean

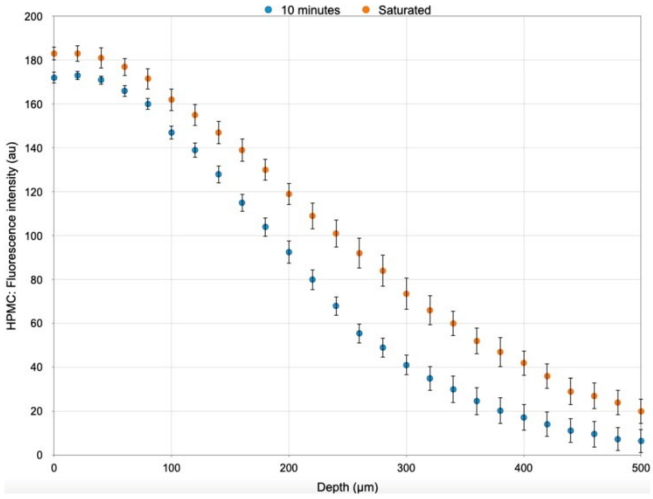

Figure 2 FI in the HPMC group for 10 minutes and after corneal saturation.

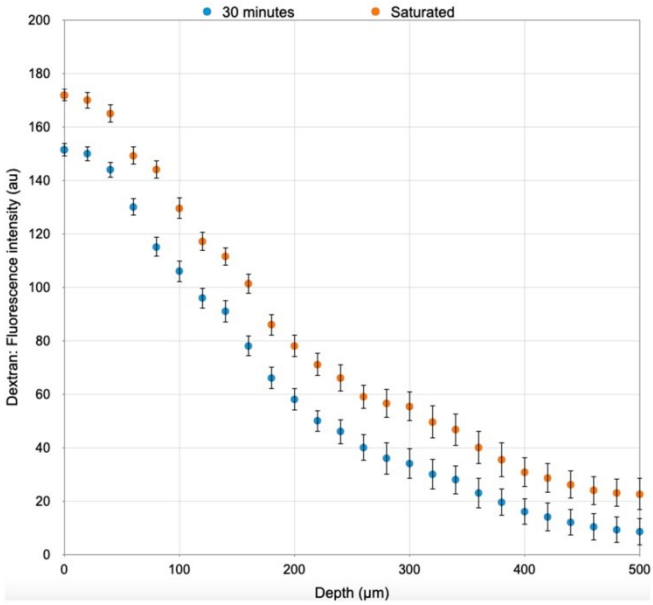

Figure 3 FI in the dextran group for 30 minutes and after corneal saturation.

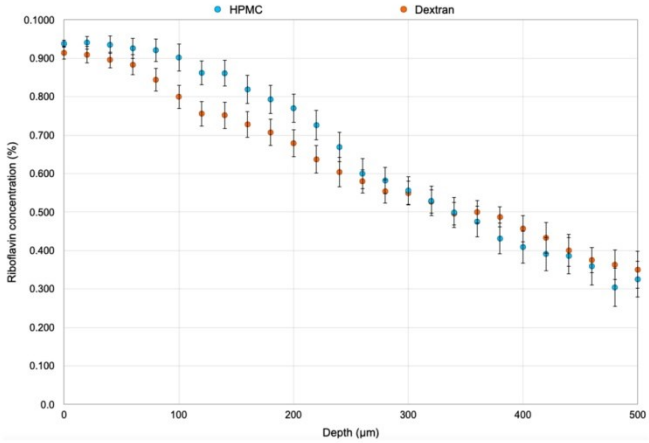

Figure 4 Riboflavin concentration curves in the HPMC (blue) and dextran (orange) groups.

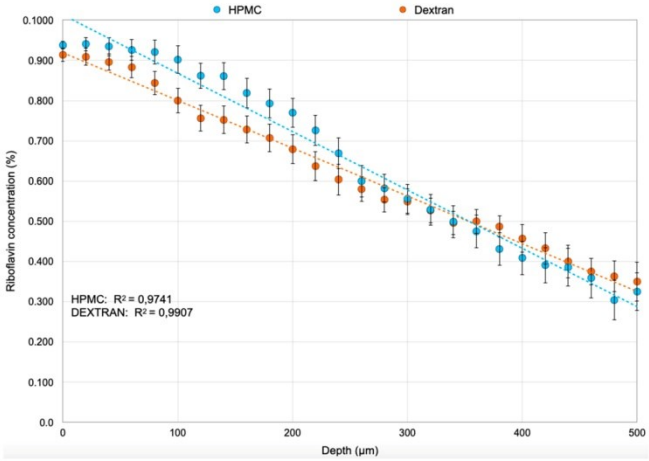

Figure 5 Linear curve fitting: HPMC (blue) and dextran (orange) groups.

tonometry obtained in the dextran group was 15 mmHg and 13 in the HPMC group.

Discussion

Riboflavin penetration is a key step in the protection and efficacy of corneal collagen crosslinking. It works as a photosensitizer for the induction of crosslinking and protects the underlying tissues as a filter from UVA irradiation. A better understanding of the behavior of each type of riboflavin in corneal tissue is essential to maximize safety.

Our study differs from previous studies because we simulated physiological conditions using methodological

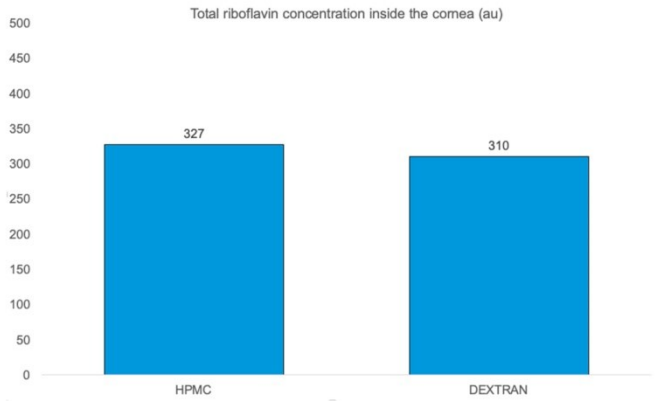

Figure 6 Area corresponding total corneal riboflavin concentration.

change. After corneal hydration control, we filled the artificial chamber with a BSS, which had characteristics similar to aqueous humor, and which is already widely used in ophthalmic surgeries aiming test conditions as close as possible to clinical conditions. Pressure control was very important because it could influence the state of hydration of the cornea and change the rate of riboflavin penetration into the stroma. Moreover, elevated pressures may alter the final effects of crosslinking on porcine corneas.[15] No reservoir was used on the cornea during soaking to simulate the exact conditions used during corneal crosslinking. Another factor also taken into account not to use the reservoir was the study[16] that described the formation of the dextran riboflavin film with 70 µm and breakup time of 22 min, while HPMC riboflavin showed tear film of 300 µm and breakup time of 32 min.

The study of riboflavin penetration in the corneal stroma has been reported by several research groups. Many recent technical variations have emerged based on the Dresden protocol,[10] including variations in irradiation time,[17] in the type of riboflavin, without corneal de-epithelialization, the use of iontophoresis,[18] as well as the use of personalized treatments.[19] The current protocols are promising, but it is necessary to study the behavior of each riboflavin in the corneal stroma to standardize behaviors and compare results.

Table 1 Comparison of the Average Corneal Thickness Obtained After Corneal Stabilization Prior to Application of Riboflavin (Before) and After the Use of Dextran Riboflavin for 30 min and HPMC Riboflavin for 10 min (After). Central Ultrasound Pachymetry (Mean ± Standard Error)

Group	Before (µm)	Final (µm)	Variation
DEXTRAN 30 min	696 +\−15	606 +\−13	−12.9%
HPMC 10 min	684 +\−17	746 +\−11	+ 9.1%

The corneal riboflavin concentration in the dextran 20% for 30 minutes was considered effective in the crosslinking procedure because it has been extensively studied. Lower absorption could affect safety. Fick's second law of diffusion describes the diffusion of riboflavin solution into the cornea.[20] The partial pressure of solved riboflavin most likely represents the driving force for diffusion, independent of the osmotic agent. The riboflavin diffusion is independent of the osmotic agent because partial pressure of solved riboflavin generates force for diffusion.

FI curve formed by the dextran group presented a behavior slightly different from standard diffusion curves, which can be explained by the variation in the optical properties of the dextran[21] that can be caused by the temperature variation during the accomplishment of TPF.

Our results showed that the concentration curves of the groups dextran 30 min. and HPMC 10 min. have similar behavior throughout the corneal thickness studied. These data show that soaking with HPMC in 10 minutes has the same effectiveness as dextran in 30 minutes. The curves cross approximately at the depth of 340 µm. HPMC group showed higher concentration in the superficial layers, but

when considering the range of 0 to 340 microns there was no statistical difference between the groups (p 0.146). We observed a higher dextran concentration of 340 to 500 microns, but with no statistically significant difference (p 0.248).

The similarity of the curves can be confirmed by complementary analysis adjusting the curves by the trend lines. The areas formed by the curves also showed by the total gradient of riboflavin concentration in the corneas studied did not present significant differences.

The majority of studies with HPMC have a concentration of 1.1%. Our study was done with HPMC riboflavin at 1% concentration.

Ehmke et al[12] did not find statistically significant differences in riboflavin concentrations (1,1% HPMC and 20% dextran) from zero to 350 μm, but they reported a higher concentration of dextran riboflavin in the first 70 μm. These results differ from those found in our study, but it is possible that this difference resulted in differences in the methodology used and HPMC different concentration. Thorsrud et al demonstrated that HPMC riboflavin has faster diffusion than dextran riboflavin.[22]

HPMC riboflavin allows a shorter procedure time than the Dresden protocol; thus, our study favors the current tendency to decrease the total procedural time of corneal crosslinking.

Some authors have demonstrated the influence of different riboflavin solutions on corneal thickness during the soaking time. The pachymetric measurements varied after the use of riboflavin, and the group with dextran showed a decrease of 12.9% in thickness after 30 min. This result has great importance in clinical use because corneas with a thickness close to 400 μm can compromise the safety of the procedure. The reduction in corneal thickness can be explained by the oncotic effect of the 20% dextran solution. The HPMC group showed 9.1% corneal thickness increase after 10 min. A previous study reported a decrease in corneal thickness of 12.1% with dextran riboflavin (30 min) and a 26.1% increase pachymetry using 1.1% HPMC riboflavin (for 20 min).[23] The saturation time of riboflavin in HPMC for 20 min in the study cited above may be the cause of the most significant increase in corneal thickness when compared to our study. Kymionis et al[24] reported a 20% thickness reduction using dextran riboflavin within 30 min.

Pachymetric measurements showed corneas with increased thicknesses, consequently, lower collagen content per volume may influence the diffusion gradient. Corneal hydration has great importance in the penetration of riboflavin because the more compact the fibers are, the greater the difficulty of absorption of riboflavin.

The concentration of the 2 solutions is similar up to 500 μm. Evaluating the depth of 340 microns that the curves intersect, we observed that depth corresponds to physiological conditions of hydration at approximately 310 microns in the HPMC group (increase 9.1%) and 395 in the dextran group (fall 12.9%).

A limitation of our research is the variation of the state of corneal hydration during the procedure.

The control of pressure within values considered normal in the artificial chamber using the Icare tonometer simulated physiological conditions, and reduced variables that could interfere the riboflavin penetration.

Conclusion

This study used different methods than previous studies to better simulate corneal physiological conditions, and used different HPMC riboflavin concentration. We concluded that 1% HPMC riboflavin for 10 min showed corneal concentration similar dextran riboflavin for 30 min therefore had the same level of safety and effectiveness in soaking when compared to the standardized use of the Dresden protocol. Ultrasonic pachymetry during the crosslinking procedure has fundamental importance corneal hydration control, due to changes in thickness caused by different types of riboflavin. Finally, our study strengthens the hypothesis that soaking with 1% HPMC riboflavin for 10 minutes is safe and promotes greater effectiveness in the total crosslinking time of corneal collagen. Clinical studies should be done to prove this hypothesis.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Ashwin PT, McDonnell PJ. Collagen cross-linkage: a comprehensive review and directions for future research. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(8):965e970. doi:10.1136/bjo.2009.164228
2. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea*. 2004;23(1):43–49. doi:10.1097/00003226-200401000-00008
3. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*. 2004;29(1):35–40. doi:10.1080/02713680490513182
4. Wollensak G, Spoerl E, Rebel F, Pillunat L, Funk R. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res*. 2003;35:324–328. doi:10.1159/000074071

5. Wollensak G, Spoerl E, Reber F, Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Eye*. 2004;18:718–722. doi:10.1038/sj.eye.6700751
6. Seiler T, Spoerl E, Huhle M, Kamouna A. Conservative therapy of keratoconus by enhancement of collagen cross-links. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:S1017.
7. Kohlhaas M, Spoerl E, Speck A, et al. A new treatment of keratectasia after LASIK with riboflavin/UVA light cross-linking. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 2005;222:430–436. doi:10.1055/s-2005-857950
8. Coskunseven E, Jankov MR, Hafezi F. Comparative study of corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA irradiation in patients with keratoconus. *J Refract Surg*. 2009;25:371–376. doi:10.3928/1081597X-20090401-02
9. Vinciguerra P, Albe E, Trazza S, et al. Refractive, topographic, tomographic, and aberrometric analysis of keratoconic eyes undergoing corneal cross-linking. *Ophthalmology*. 2009;116(3):369–378. doi:10.1016/j.ophtha.2008.09.048
10. 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. doi:10.1016/S0002-9394(02)02220-1
11. Schumacher S, Heftier L, Mrochen M. Equivalence of biomechanical changes induced by rapid and standard corneal cross-linking, using riboflavin and ultraviolet radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):9048–9052. doi:10.1167/iovs.11-7818
12. Ehmke T, Seiler TG, Fischinger I, et al. Comparison of corneal riboflavin gradients using dextran and HPMC solutions. *J Refract Surg*. 2016;32(12):798–802. doi:10.3928/1081597X-20160920-03
13. Seiler TG, Ehmke T, Fischinger I, et al. Two-photon fluorescence microscopy for determination of the riboflavin concentration in the anterior corneal stroma when using the dresden protocol. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(11):6740–6746. doi:10.1167/iovs.15-17656
14. Gore DM, Margineanu A, French P, et al. Two-photon fluorescence microscopy of corneal riboflavin absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(4):2476–2481. doi:10.1167/iovs.14-13975
15. McQuaid R, Li J, Cummings A, Mrochen M, Vohnsen B. Second-harmonic reflection imaging of normal and accelerated corneal cross-linking using porcine corneas and the role of intraocular pressure. *Cornea*. 2014;33(2):125–130. doi:10.1097/ICO.0000000000000015
16. Wollensak G, Aurich H, Wiberlauer C, Sel S. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg*. 2010;36(1):114–120. doi:10.1016/j.jcrs.2009.07.044
17. Ozgurhan EB, Akcay BI, Kurt T, Yildirim Y, Demirok A. Accelerated corneal collagen cross-linking in thin keratoconic corneas. *J Refract Surg*. 2015;31:386–390. doi:10.3928/1081597X-20150521-11
18. Jouve L, Borderie V, Sandali O, et al. Conventional and iontophoresis corneal cross-linking for keratoconus: efficacy and assessment by optical coherence tomography and confocal microscopy. *Cornea*. 2017;36(2):153–162. doi:10.1097/ICO.0000000000001062
19. Cassagne M, Pierné K, Galiacy SD, et al. Customized topography-guided corneal collagen cross-linking for keratoconus. *J Refract Surg*. 2017;33(5):290–297. doi:10.3928/1081597X-20170201-02
20. Siepmann J, Kranz H, Bodmeier R, et al. HPMC-matrices for controlled drug delivery: a new model combining diffusion, swelling, and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics. *Pharm Res*. 1999;16(11):1748–1756. doi:10.1023/A:1018914301328
21. Xu X, Wang RK, Elder JB, Tuchin VV. Effect of dextran-induced changes in refractive index and aggregation on optical properties of whole blood. *Phys Med Biol*. 2003;48(9):1205–1221. doi:10.1088/0031-9155/48/9/309
22. Thorsrud A, Hagem AM, Sandvik GF, Drolsum L. Superior outcome of corneal collagen cross-linking using riboflavin with methylcellulose than riboflavin with dextran as the main supplement. *Acta Ophthalmol*. 2019;97(4):415–421. doi:10.1111/aos.13928
23. Zaheer N, Khan WA, Khan S, Khan MAM. Comparison of changes in central corneal thickness during corneal collagen cross-linking, using isotonic riboflavin solutions with and without dextran, in the treatment of progressive keratoconus. *Cornea*. 2018;37(3):340–346. doi:10.1097/ICO.0000000000001496
24. Kymionis GD, Kounis GA, Portaliou DM, et al. Intraoperative pachymetric measurements during corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet A irradiation. *Ophthalmology*. 2009;116(12):2336–2339. doi:10.1016/j.ophtha.2009.09.018

Clinical Ophthalmology Dovepress

Publish your work in this journal

Clinical Ophthalmology is an international, peer-reviewed journal covering all subspecialties within ophthalmology. Key topics include: Optometry; Visual science; Pharmacology and drug therapy in eye diseases; Basic Sciences; Primary and Secondary eye care; Patient Safety and Quality of Care Improvements. This journal is indexed on PubMed Central and CAS, and is the official journal of The Society of Clinical Ophthalmology (SCO). The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit http://www.dovepress.com/testimonials.php to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: https://www.dovepress.com/clinical-ophthalmology-journal