

## REVISION BIBLIOGRAFICA

**Enlaces cruzados corneales: una nueva alternativa en el tratamiento de las ectasias.****Corneal crossed links: a new alternative in the treatment of ectasia.**

Dra. Maygret Alberro Hernández,<sup>(1)</sup> Dra. Janet González Sotero,<sup>(1)</sup> Dra. Haymy Caridad Casanueva Cabezas,<sup>(1)</sup> Dr. Eduardo Rojas Álvarez.<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup>*Especialista de I Grado en Medicina General Integral. Residente de segundo año en Oftalmología. Facultad Cubana de Oftalmología.*

<sup>1</sup>*Second Professional Degree in General Comprehensive Medicine. Second Year Resident, Ophthalmology. Cuban Ophthalmological Faculty.*

**RESUMEN**

Los enlaces cruzados son una técnica que favorece el incremento de la formación de enlaces covalentes, por un proceso de fotooxidación, entre la fibras de colágeno y propician la estabilización biomecánica de la córnea. El objetivo principal al realizarlos es detener la progresión de ectasia. Las indicaciones incluyen el queratocono y la degeneración marginal pelúcida. Puede reducir la necesidad de queratoplastia penetrante y resulta muy eficaz en el tratamiento y profilaxis de la queratectasia posterior a la ablación por láser excimer. Numerosos artículos revisados demuestran la seguridad y eficacia de este procedimiento. La microscopía confocal ha mostrado engrosamiento y resistencia significativa del estroma corneal después de realizado y que permanecen sin cambios la densidad de células endoteliales y la transparencia del cristalino y la córnea. Es una técnica simple, segura y no invasiva con resultados prometedores. Al ser poco costosa y más simple, podría ser particularmente útil en países en vías de desarrollo donde el trasplante corneal y otros procedimientos suelen ser de difícil acceso.

**Palabras clave:** córnea; dilatación patológica; enfermedades de la cornea; cirugía láser de cornea; procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos; biomecánica; foto oxidación; colágenos fibrilares

**Límites:** Humanos; adulto

**ABSTRACT**

Cross-linking a technique that allows increasing the creation of covalent links through the process of photo-oxidation among the collagen fibers and enhance the corneal biomechanical stabilization. The main objective of this procedure is to stop the development of ectasia. The indications include the Keratoconus and Pellucid Marginal Degeneration. This can reduce the necessity for permanent keratoplasty and is highly efficient in the treatment and prophylaxis of keratectasia after ablation caused by laser. Many reviewed articles prove the security and efficacy of this treatment. The confocal microscopy techniques have shown significant swelling and resistance of corneal stroma after this procedure. Density of endothelial cell and transparency of the cornea and crystallin remain unchanged. This is a simple, safe and non-invasive technique with promising results. Since this is not expensive it could be particularly useful in developing countries where corneal transplant and other procedures are very expensive.

**Key words:** cornea; dilatation pathologic; corneal diseases; corneal surgery, laser; surgical procedures, minimally invasive; biomechanics; photooxidation; fibrillar collagens

**Limits:** Humans; adult

**Recibido:** 29 de julio de 2009

**Aprobado:** 14 de agosto de 2009

**Correspondencia:**

Dra. Maygret Alberro Hernández.

Facultad Cubana de Oftalmología.

**Dirección electrónica:** [experimental@infomed.sld.cu](mailto:experimental@infomed.sld.cu)

## INTRODUCCIÓN

La idea de reforzar de forma terapéutica las estructuras de colágeno, tiene un historial en medicina de más de 30 años. La finalidad de estas bioprótesis ha sido utilizar tejidos con mayor resistencia biomecánica, menos propensos a la degradación y a la calcificación. Estas mallas de colágeno reforzado se han aplicado en múltiples dispositivos biomédicos como: prótesis valvulares, dispositivos de liberación de fármacos, substitutos de piel, entre otros.<sup>(1)</sup>

No es hasta la década de los 90 que la ciencia de la fotobiología comienza a investigar acerca de los enlaces moleculares que podrían activarse utilizando una fuente de calor o de luz, capaz de incrementar la resistencia del colágeno estromal. Se concluyó que ocurría a través de una acción de oxidación activada mediante la liberación de los radicales oxidrónicos.<sup>(2)</sup> Por ello, en el año 1993, se introduce esta técnica en Oftalmología, de la mano de un grupo de investigadores alemanes. Fue nombrada como "*crosslinking corneal*".<sup>(3)</sup> De este modo, esta nueva terapia mínimamente invasiva inicia un nuevo capítulo en el tratamiento de las afecciones corneales por ectasia, construyendo el camino hacia un enfoque estimulante y "conservador", cuyo fin es evitar, o al menos retrasar, la evolución típica de la enfermedad, los trasplantes convencionales y sus consecuencias éticas y socio - sanitarias.<sup>(1,2)</sup>

Dada la importancia de este procedimiento y la necesidad de su mejor conocimiento para el tratamiento de las afecciones corneales por ectasia, decidimos hacer esta revisión con el objetivo de determinar las principales características de los enlaces cruzados, su aplicación y proyecciones futuras.

## DESARROLLO

El *crosslinking*, término que podría traducirse por enlaces cruzados, es un tipo de reacción química que produce nuevos enlaces que aumentan la resistencia de los tejidos. Este fenómeno sucede de manera habitual en la naturaleza y es responsable del endurecimiento lento y progresivo de los tejidos vivos y de los materiales inertes.<sup>(1)</sup>

De manera conceptual, se define como una reacción de polimerización de colágeno bioquímica, enzimática o fotodinámica, natural o inducida, caracterizada por la formación intra o interhélice de enlaces covalentes capaces de incrementar la resistencia de un tejido.<sup>(2)</sup>

Existen varias modalidades de enlaces cruzados, entre las que encontramos<sup>(1)</sup>:

1. Enlace cruzado enzimático (acción de la enzima lisil-oxidasa y de los aldehídos de la glucosa a través de endoproductos de glicosilación avanzada).
2. Enlace cruzado químico (glutaraldehído, formaldehído).
3. Enlace cruzado fotoquímico (rayos ultravioletas A (UVA), radiaciones ionizantes).

4. Enlace cruzado fotooxidativo (riboflavina/ UVA), el cual constituye el tema fundamental de este artículo de revisión.

Cuando hablamos de "*crosslinking corneal*", nos referimos a un reforzamiento de la córnea al incrementar el número de uniones entre las láminas de colágeno, haciéndola menos elástica y más resistente al estiramiento.

Existen varios tipos de enlaces cruzados corneales<sup>(2)</sup>:

- Enlace cruzado fisiológico o relacionado con la edad. En córneas envejecidas se observa un mecanismo de endurecimiento y engrosamiento de las fibras de colágeno, donde la glicosilación de las moléculas de tropocolágeno juega un importante papel. La enzima lisil-oxidasa (LOX) y los aldehídos de la glucosa son los responsables de este fenómeno.
- Enlace cruzado patológico dismetabólico, relacionado con enfermedades como la diabetes mellitus, debido al efecto *crosslinking* de la glucosa natural. La hiperglucemia produce un incremento de la resistencia corneal que genera el fenómeno conocido como reacción de Maillard. Los aldehídos de la glucosa a través de los AGEs (endoproductos de glicosilación avanzada) juegan un papel fundamental en este tipo de enlace cruzado terapéutico inducido fotobiológicamente. Esta es la técnica a la que nos referiremos a continuación.

Un grupo de investigadores de la Universidad de Dresden, Alemania (Wollensak, Spoerl y Seiler), introducen el enlace cruzado terapéutico al realizar estudios de seguridad, toxicidad y eficacia en animales (cerdo y conejo).<sup>(3,4)</sup> Ellos trabajaron en la posibilidad de frenar el progreso de la enfermedad ectásica para retrasar o impedir la necesidad de una queratoplastia. Las premisas eran que los pacientes diabéticos jóvenes no desarrollaban queratocono y los casos excepcionales que lo hacían no progresaban debido a que la glucosa provocaba un efecto de *crosslinking* natural en las fibras del colágeno incrementando la resistencia biomecánica de su córnea.<sup>(3,5)</sup> Desde entonces, este procedimiento ha extendido su aplicación a numerosos países como Italia, Estados Unidos y España.

La técnica se basa en un proceso de fotosensibilización mediante riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) y radiación ultravioleta A (UVA). Estos autores<sup>(2)</sup> consiguieron demostrar que la aplicación de una solución de riboflavina al 0,1 % y dextrano al 20 % era absorbida por la córnea una vez que se había extraído el epitelio, permitiendo la aplicación segura de una radiación ultravioleta A de 365 a 370 nm. sin lesionar el endotelio ni otras estructuras intraoculares.

La riboflavina o vitamina B<sub>2</sub> tiene una fórmula empírica C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> y disuelta en agua tiene una coloración entre naranja y amarillo-anaranjado. Su pico de absorción máximo es a 370 nanómetros (nm). En la técnica de enlace cruzado se emplea a una concentración del 0,1 % que optimiza su coeficiente de absorción.<sup>(6)</sup> Esta

substancia tiene una misión doble, por una parte al ser activada por la radiación ultravioleta libera radicales libres que van a realizar las uniones entre las fibras de colágeno y por otra parte actúa como un filtro de las radiaciones UVA permitiendo que solo un 5 % de la energía aplicada pase a las estructuras intraoculares. Muchos autores<sup>(4,7,8)</sup> refieren que, para que la riboflavina sea absorbida por la córnea, es condición imprescindible que se extraiga el epitelio. Pinelli<sup>(9)</sup>, por el contrario, en un estudio multicéntrico realizado en Italia en el 2006, observó mediante fluoroscopia, que el epitelio no limita de manera significativa la penetración de riboflavina hacia el estroma corneal, pero esto sigue en estudio todavía. Los autores de este trabajo consideran que es importante la desepitelización previa a la realización de este proceder ya que la presencia de uniones estrechas o "tight junctions" y de hemidesmosomas a nivel del epitelio limita la penetración de riboflavina hacia el estroma corneal.

El dextrano es un polisacárido ramificado constituido de muchas moléculas de glucosa unidas en cadenas de longitud variable (de 10 a 150 Kilodaltons). Se emplea junto al fotoactivador luego de la desepitelización corneal y su finalidad es mantener la presión osmótica de la córnea, impidiendo que se modifique su grosor. Su concentración adecuada es al 20 %. Muchos cirujanos sólo usan la riboflavina pero otros prefieren esta combinación tan efectiva.<sup>(4)</sup>

En relación con la radiación ultravioleta, Wollensak y col.<sup>(3)</sup>, estimaron que la energía adecuada era de 3.00 mW/cm<sup>2</sup> actuando sobre un área de 7 a 9 mm de córnea desepitelizada. Si se administrara la dosis recomendada sobre una córnea virgen, sólo sería filtrado por esta un 30 % y pasaría a las estructuras oculares una dosis de 2,10 mW/cm<sup>2</sup>, absorbida por el cristalino el 50 % y el resto por la retina. Sin embargo, cuando aplicamos la energía en una córnea desepitelizada y embebida en riboflavina, ésta actúa como filtro de la luz UVA limitando el paso de la energía a solo un 3 % de la cantidad original, con lo que esta dosis (0,09 mW/cm<sup>2</sup>) ya no es tóxica para el endotelio ni las estructuras intraoculares.

Los umbrales citotóxicos calculados para la energía UVA son para los queratocitos de 0,5 mW/cm<sup>2</sup>, la citotoxicidad se produce en las 270 µm superficiales del estroma corneal, y para el endotelio 0,3 mW/cm<sup>2</sup>, citotoxicidad sólo si la cornea es de un grosor menor 350 µm. Se considera un colchón de seguridad añadir 50 µm, por lo que no debiera realizarse el procedimiento en córneas de menos de 400 µm.<sup>(7)</sup>

En experimentos animales, se demostró que los queratocitos presentan muerte celular hasta los 350 µm de profundidad. A los seis meses, el área vuelve a poblarse y, en contraposición a lo que ocurre con las células endoteliales, los queratocitos pueden reproducirse. La pérdida de células en el estroma corneal no es considerada crítica, pero se recomienda la

realización de estudios con microscopia a largo plazo, para verificar la repoblación de queratocitos, especialmente en casos de enlace cruzado para tratar queratectasia iatrogénica posterior a LASIK.<sup>(2,10)</sup>

Al realizar el enlace cruzado, se crean uniones químicas adicionales que producen córneas más compactas, fuertes y resistentes a la deformación biomecánica o ectasia.<sup>(2,11)</sup> Estos cambios en la arquitectura corneal pueden llegar a evitar o retardar el trasplante y se ha demostrado la detención de la enfermedad, en el caso del queratocono, hasta 3 y 5 años después del tratamiento.<sup>(12,13)</sup>

La técnica quirúrgica es muy sencilla pero potencialmente peligrosa si no se sigue el protocolo indicado. Se han reportado múltiples protocolos de tratamientos. Su secuencia es la siguiente:<sup>(1,5)</sup>

1. Instilación de anestésico tópico 5 minutos previos al tratamiento.
2. Se coloca un espéculo palpebral y se remueve el epitelio central de la córnea en un diámetro de 8,5 a 9 mm. utilizando descascarificador o cuchilete redondo. Existe un instrumento llamado perturbador epitelial Daya con puntas concéntricas para realizar micropunciones epiteliales y evitar tener que remover todo el epitelio y sus consiguientes molestias.
3. Administración tópica de la solución de riboflavina (fotoactivador). Se aplica cada 3 minutos por 15 minutos. Muchos cirujanos utilizan la combinación riboflavina (0,1 %) - dextrán (20 %).<sup>(2)</sup> Debe esperarse de 5 a 10 minutos para la absorción del fotoactivador por el tejido corneal.
4. Comprobación de la saturación del fotoactivador.
5. Aplicación de la radiación UVA. Es importante cumplir con las especificaciones de este tratamiento como son: distribución uniforme de la energía UVA a 370 nm, distancia de trabajo de 15 cm, potencia máxima de emisión de 4 mW/cm<sup>2</sup> y potencia máxima de densidad de 3 mW/cm<sup>2</sup>.
6. Durante la irradiación, seguir administrando fotoactivador a razón de 1 gota cada 5 minutos. Se usa el equipo UV-X<sup>TM</sup>, que emite luz UV -A con una longitud de onda de 365 nm. Después de 30 minutos, el UV-X se desconecta automáticamente.
7. Tras finalizar la irradiación, se aplican gotas antibióticas y se coloca un lente blando terapéutico por 3 a 5 días.
8. Tratamiento medicamentoso como en la queratectomía fotorrefractiva (PRK). Se emplean antiinflamatorios como fluorometilona o prednisolona al retirar el lente durante el primer mes, gotas antibióticas durante los primeros 10 días y lágrimas artificiales hasta que reepitelice la córnea.

El proceso de enlace cruzado actualmente está en una fase inicial y como cualquier técnica de tratamiento puede tener muchas mejoras, por ejemplo la desepitelización corneal resulta molesta para el paciente

y puede contribuir a la inducción de haze.<sup>(2)</sup> Por dicha razón, se está comenzando a probar la realización de un bolsillo corneal con intralase (un tipo de láser de femtosegundo) y aplicar dentro de ese "bolsillo" la riboflavina. Si con este método se obtienen buenos resultados el paciente tendría menos molestias.<sup>(9)</sup> Kanellopoulos AJ<sup>(13)</sup>, describe la creación de un bolsillo corneal central con láser de femtosegundo a una profundidad de 100µm administrando dentro de este la riboflavina al 0,01 %, con un efecto similar al tradicional mediante la aplicación por 15 min. de luz UV de 365 nm. (6mW/cm<sup>2</sup>)

Así mismo se intenta acortar el tiempo de exposición a la luz ultravioleta de treinta minutos, modificando la energía utilizada. Para ello se está trabajando en un nuevo método rápido de enlace cruzado llamado "*flashlinking*", el cual ha sido introducido usando un agente fotoactivo personalizado. Este agente del *flashlinking* es una mezcla fotoquímica multicomponente (>3) que se activa con la exposición de UVA en una reacción no exotérmica para formar un hidrogel que puede absorber el 80 % del agua. En contraste con el enlace cruzado de riboflavina-UVA, es oxígeno-independiente y requiere una corta exposición a la radiación UVA produciendo una reacción fotoquímica. Además tiene la propiedad de formar el material de hidrogel dentro de la córnea y no produce puramente el enlace cruzado intraestromal.<sup>(14)</sup> Comparado con el procedimiento normal, se ha demostrado similar eficacia en relación con el endurecimiento corneal, pero la ventaja del *flashlinking* radica en la reducción del tiempo de exposición a UVA de 30 minutos a 30 segundos.<sup>(14,15)</sup> Sin embargo se considera que son necesarios más estudios que demuestren su eficacia, antes de que pueda introducirse esta técnica en la práctica clínica.

Todavía se desconoce la duración del endurecimiento que produce este procedimiento, no obstante se estima que la renovación ocurra completamente entre los 2 y 10 años.<sup>(11)</sup> Por lo tanto, a largo plazo podría ser necesario repetir el tratamiento únicamente en aquellos casos en que se documente una aceleración clínico-topográfica de la enfermedad. El tratamiento nunca se ha vuelto a repetir, ya que desde su comienzo en la década de los 90 hasta la fecha, no ha habido ningún caso de aceleración de la enfermedad.<sup>(16)</sup>

Este tratamiento tiene indicaciones precisas. Se emplea en las enfermedades ectásicas de la córnea (queratocono, degeneración marginal pelúcida) y las ectasias iatrogénicas o secundarias a cirugía corneal.<sup>(2,7,12)</sup> Otras indicaciones incluyen el tratamiento de úlceras infecciosas tórpidas, de la queratopatía bullosa, un reforzamiento corneal previo tratamiento con láser excimer, asociación con otras técnicas moldeadoras de la córnea como los segmentos intracorneales, la queratoplastia conductiva o lentes de contacto.<sup>(2,7,17,18)</sup> En el caso de ulceración corneal progresiva, además de fortalecer la córnea debilitada, permite que la irradiación

de UVA esterilice los gérmenes infecciosos y se detiene el proceso queratolítico.<sup>(9)</sup>

Existen contraindicaciones para su uso. Sólo se incluyen las embarazadas dentro de las contradicciones generales y dentro del punto de vista ocular se dividen en:

- ◇ Absolutas: Paquimetría menor de 400 µm, leucomas corneales importantes, enfermedades autoinmunes o pacientes propensos a queloides, daño endotelial previo. Antecedentes de queratitis herpética, síndrome de ojo seco severo, presencia de infecciones corneales en el lugar de tratamiento.
- ◇ Relativas: La edad, inicialmente se consideraba una contraindicación en menores de 18 años, aunque hoy cada vez hay más partidarios de realizar la técnica en niños con queratocono progresivo. En mayores de 50 años se discute si la técnica pueda tener algún valor.<sup>(2)</sup>

En el tratamiento del queratocono presenta varias ventajas: aumenta la resistencia corneal, mejora la agudeza visual, regulariza la forma de la córnea a la vez que potencia el efecto de los anillos o segmentos intracorneales. Munish S. y colaboradores<sup>(17,18)</sup> demostraron cómo el tratamiento de crosslinking con riboflavina potencia el efecto de los anillos intraestromales (Intacs) en ectasias *post-LASIK* y en el queratocono.

Tras la aplicación del enlace y posterior reepitelización, podemos observar una serie de cambios en la córnea del paciente como son la presencia de una línea de demarcación longitudinal en el estroma corneal delimitando la zona anterior tratada de un color más blanquecino, la cual corresponde a un área de depleción de queratocitos, edema intraestromal y ausencia de fibras nerviosas como demostraron Mazzota y col<sup>(19-21)</sup> en estudios mediante microscopía. Este autor también pudo comprobar que el estroma posterior y el endotelio no sufrían cambios significativos.

Desde el punto de vista clínico los resultados inicialmente reportados por el grupo de Dresden<sup>(5)</sup> hablaban de ausencia de progresión del queratocono; en el 81,7 % había una regresión de las queratometrías máximas de -2,87 dioptrías (±2,56) y la agudeza visual posoperatoria mejoró en 1,4 líneas (±2,04). Este grupo no encontró complicaciones y tampoco afectación del cristalino ni del endotelio. Caporossi y col<sup>(20)</sup> en un estudio realizado en el 2006, encontraron una mejoría significativa de la agudeza visual no corregida tras el tratamiento, reducción en las queratometrías mediante topografía, mejoría en la simetría corneal en el estudio aberrométrico, importante reducción en la asimetría entre los hemimeridianos verticales y ausencia de daño endotelial o incremento de la tensión ocular.

A pesar de ser un procedimiento simple y no invasivo, se han reportado diversas complicaciones tras su aplicación<sup>(16,21,22)</sup> como son: presencia de haze precoz y tardío (al año), edema corneal precoz, pérdida de más de 2 líneas de visión, queratitis lamelar difusa, queratitis herpética

con iritis y endotelitis. Se han observado otras derivadas de la radiación ultravioleta<sup>(2)</sup> como son la fotoqueratitis en la córnea, catarata en el cristalino y daño térmico o fotoquímico en la retina. Además, los radicales libres y agentes oxidantes liberados durante la exposición de los tejidos de la córnea empapados en riboflavina también pueden representar un riesgo fotoquímico para las estructuras del segmento anterior.

### CONCLUSIONES

El objetivo fundamental al realizar este procedimiento consiste en detener la progresión de la ectasia corneal

ya sea primaria, secundaria o de causa iatrogénica. Numerosos artículos revisados apoyan y demuestran su seguridad y eficacia. Sus aplicaciones en la queratitis infecciosa, la queratopatía bullosa y otras, extienden los usos potenciales de esta tecnología. Esta técnica ha disparado las expectativas de médicos y pacientes y no cabe duda que parece ser el único medio para combatir la fisiopatología del queratocono; además, podría ser particularmente útil en países en vías de desarrollo donde el trasplante corneal y otros procedimientos suelen ser de difícil acceso.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mazzotta C. Chemical and physical background of combined Riboflavin UV-A treatment for keratoconus. *Cornea*. 2002; 21: 212-9.
2. Cadarso L. Cross-linking corneal en el tratamiento de la ectasia corneal. *El Clarín*[en línea] 2006 11 01; Sec. Oftalm: 4(2). Disponible en: <http://www.clarin.com/diario/2006/11/01/conexiones/t-01300820.htm>.
3. Wollensak G, Spoerl E. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res*. 2003; 35(6): 324-8.
4. Wollensak GE, Wilsch M. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea*. 2004; 23(5): 503-7.
5. Wollensak GE, Spoerl E. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003; 135(5): 620-7.
6. Wollensak Ge, Aurich H. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A.J *Cataract Refract Surg*. 2007; 33(3): 516-21.
7. Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E. A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: Preliminary results. *J Refract Surg*. 2008; 24:720-5.
8. Hayes S, O'Brart DP. Effect of complete epithelial debridement before riboflavin-ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy. *J Cataract Refract Surg*. 2008; 34(4): 657-61.
9. Pinelli R. C3-R treatment opens new frontiers for keratoconus and corneal ectasia. *Eyeworld*. 2007; 12:34-6.
10. Bottós KM, Dreyfuss JL, Regatieri CV. Immunofluorescence confocal microscopy of porcine corneas following collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A. *J Refract Surg*. 2008; 24:715-9.
11. Kohlas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Witting C, Pillnat LE. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *J Cataract Refract Surg*. 2006; 32:279-83.
12. Morén P. La técnica 'Crosslinking' puede evitar o retrasar el trasplante de córnea. *Diario médico* [en línea] 2007 04 03; Sec. Oftalm: 2(1). Disponible en: [http://www.diariomedico.com/edicion/diario\\_medico/especialidades/oftalmologia/es/desarrollo/866090.html](http://www.diariomedico.com/edicion/diario_medico/especialidades/oftalmologia/es/desarrollo/866090.html).
13. Kanellopoulos AJ, Binder PS. Collagen cross-linking with sequential topography-guided PRK: A temporizing alternative for keratoconus to penetrating keratoplasty. *Cornea*. 2007; 26:891-5.
14. Rocha KM, Ramos-Esteban JC, Qian Y. Comparative study of riboflavin-UVA cross-linking and "flash-linking" using surface wave elastometry. *J Refract Surg*. 2008; 24:748-51.
15. Krueger RR, Rocha KM, Ventura J. Photochemical corneal augmentation of experimental lamellar graft dissection by cross-linking of collagen gel into a corneal tissue substitute. *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO)*. 2008; 23:2346.
16. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S, Sergio P, Caporossi T, et al. Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-UVA-induced Cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation of corneal epithelium and sub-epithelial nerve plexus regeneration by in vivo HRT II system confocal microscopy in humans. *European Journal Ophthalmology*. 2006; 16:38-41.
17. Munish S, Brian S, Boxer W. C3-R (corneal collagen crosslinking with riboflavin) increases Effect (lower L-U Ratio) of Single Segment Intacs in post-LASIK Ectasia and Keratoconus. Paper presented at: American Academy of Ophthalmology Annual Meeting, 2005.
18. Boxer Wachler BS, Christie JC, Chou B. Intacs for the treatment of keratoconus. *Ophthalmology*. 2003; 110:1031-40.
19. Mazzotta C, Balestrazzi A. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of

- corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea*. 2007; 26(4): 390-7.
20. Caporossi A, Baiocchi S. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study. *J Cataract Refract Surg*. 2006; 32(5): 837-45.
21. Kymionis GD, Bouzoukis DI. Diffuse lamellar keratitis after corneal crosslinking in a patient with post-laser in situ keratomileusis corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg*. 2007; 33(12): 2135-7.
22. KymionisGD, Portaliou DM. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2007; 33(11): 1982-4.