Il Cross-linking corneale Riboflavina-UVA

A cura di:

Aldo Caporossi, Cosimo Mazzotta, Stefano Baiocchi, Claudio Traversi

Dipartimento di Scienze Oftalmologiche e Neurochirurgiche
Università degli Studi di Siena

In collaborazione con:

oftahi-tech

Il Cross-linking corneale Riboflavina-UVA

A cura di:
Aldo Caporossi, Cosimo Mazzotta,
Stefano Baiocchi, Claudio Traversi

Dipartimento di Scienze Oftalmologiche e Neurochirurgiche
Università degli Studi di Siena

In collaborazione con:

oftahi-tech

Sommario

6 *Prefazione*

7 **Il Cheratocono**

8 **Terapia del Cheratocono**

10 **Indicazioni del Cross-linking**

11 **Casistica di Siena**

12 **Scheda tecnica**

14 ***Principali riferimenti bibliografici***

Prefazione

"Possiamo affermare con ragionevole obbiettività che l'origine del Cheratocono è tutt'ora incerta. Molti dei meccanismi fisiopatologici ed eziopatogenetici alla base della malattia sono conosciuti ma molto di più è ancora da scoprire. Si tratta di una "distrofia ectasica" della cornea di natura genetica assai complessa in cui indubbiamente giocano un ruolo attivo anche numerosi fattori estrinseci. La possibilità offerta oggi da questo nuovo approccio "patogenetico" che con entusiasmo abbiamo introdotto in Italia per la prima volta (Cross-linking del collagene corneale riboflavina-Uva) a nostro avviso potrebbe aprire la strada alla prevenzione della progressione del Cheratocono. D'altra parte crediamo che la terapia genica in futuro potrà invece aprire la strada alla prevenzione della insorgenza stessa della malattia o alla sua diagnosi precoce in fase pre-clinica, consentendo anche di distinguere sulla base di specifiche mutazioni tra forme evolutive e forme stazionarie o scarsamente evolutive con le relative ricadute sul piano prognostico e terapeutico. Sappiamo che generalmente dopo la 3-4° decade il Cheratocono tende spontaneamente ad autolimitarsi per effetto di modificazioni biochimiche età-correlate e fattori ancora ignoti tuttavia la sua progressività è comunque imprevedibile e l'età di insorgenza condiziona fortemente la potenziale necessità di un approccio chirurgico. Ricordiamo infine che solo una parte dei pazienti affetti da Cheratocono è destinata alla chirurgia, specie se l'alterazione del profilo corneale consente una buona tollerabilità alle lenti a contatto che devono essere ben coerenti con la superficie corneale. Non va inoltre sottovalutato che un buon numero di pazienti con Cheratocono in fase iniziale e non evolutivo può ottimizzare la sua visione anche con una adeguata correzione a tempiale cui va sempre posta la massima attenzione".

Aldo Caporossi, Cosimo Mazzotta e Stefano Baiocchi

Il Cheratocono

Il *Cheratocono* è una malattia degenerativa non infiammatoria della cornea ad esordio puberale (tra i 12 e i 15 anni) e generalmente bilaterale. Si tratta di una malattia progressiva ad andamento capriccioso e generalmente sporadica, tuttavia esistono forme ereditarie di tipo familiare trasmissibili come carattere dominante nel 10 % dei pazienti. Nel 20 % dei casi i pazienti affetti da cheratocono possono andare incontro a intervento chirurgico.

L'incidenza del cheratocono riportata in letteratura è di 1/2000 casi nella popolazione generale tuttavia, a nostro avviso e secondo statistiche più recenti, tali valori appaiono significativamente sottostimati e alla luce della diffusione delle indagini Topo-Tomografiche e Pachimetriche incidenze sulla popolazione generale di 1/600-1/320 risultano più aderenti alle attuali capacità diagnostiche. Alterazioni a carico della struttura del collagene corneale, della sua organizzazione, della sostanza intercellulare nonché apoptosi e necrosi cheratocitaria con alterazioni prevalenti o esclusive a carico dello stroma anteriore-intermedio e nella lamina di Bowmann sono state ampiamente documentate: tutto questo insieme rende ragione di una cornea strutturalmente e biomeccanicamente *"debole"*.

Il Cheratocono rappresenta la maggiore causa di Trapianto di Cornea in Italia ed in Europa e la seconda negli USA dopo la cheratopatia bollosa.
Il numero di trapianti di cornea effettuati in Italia è oggi in continua crescita e si stima che il fabbisogno annuo per la popolazione italiana sia di circa 120 -130 trapianti/anno per milione di popolazione (circa 6.000 interventi annui in Italia secondo i dati della SITRAC: Società Italiana Trapianto di Cornea).

Secondo lo studio epidemiologico condotto dalla SITRAC, rispetto al numero totale di circa 5300 cornee trapiantate per anno in Italia tra il 1997 e il 2001, circa 2500 cornee sono destinate al trattamento di patologie ectasiche, di cui il Cheratocono è la principale. Questi risultati sono stati confermati dalla Banca degli Occhi del Veneto (studio Cortes), di Monza ed Emilia Romagna che attribuiscono al Cheratocono oltre la metà (54%) dei trapianti di cornea effettuati in Italia.

Terapia del Cheratocono

Fino ad oggi non esisteva alcuna terapia in grado di prevenire la progressione del cheratocono e tutte le proposte terapeutiche mini-invasive come gli anelli intrastromali (INTACS) sono rivolte esclusivamente alla cura degli effetti refrattivi (astigmatismo e miopia) secondari alla malattia. L'individuazione di una *"terapia etio-patogenetica"* come il *cross-linking* del collagene corneale potrebbe fortemente ridurre la percentuale dei pazienti che arriverà alla chirurgia.

Abbiamo introdotto in Italia per la prima volta presso il Dipartimento di Scienze Oftalmologiche e Neurochirurgiche dell'Università di Siena questa metodica per il trattamento del cheratocono evolutivo con il progetto *SIENA EYE CROSS 2004, PREMIATO DALLA SOCIETA' OFTALMOLOGICA ITALIANA COME "MIGLIORE RICERCA DELL'ANNO 2004 IN OFTALMOLOGIA IN ITALIA".*

Il *"cross-linking"* del collagene corneale Riboflavina-UVA indotto consiste nella fotopolimerizzazione delle fibrille del collagene stromale con lo scopo di aumentarne la rigidità e la resistenza alla cherato-ectasia attraverso l'azione combinata di una sostanza foto-sensibilizzante (riboflavina o vitamina B2) e fotoassorbente con l'irraggiamento mediante luce ultravioletta da illuminatore in stato solido di tipo UVA.
Essa ha un potenziale impatto socio-sanitario di grande rilievo e potrebbe consentire, qualora i risultati a lungo termine (oltre 5 anni) lo confermino, una riduzione della necessità di trapianti corneali, se applicata al cheratocono ancora in fase rifrattiva, intorno al 50%.

Fin dai primi anni 90' furono effettuati i primi studi di fotobiologia per cercare di individuare *"collanti biologici"* attivabili con sorgenti termiche o luminose in grado di incrementare la resistenza del collagene stromale giungendo alla comprensione che l'azione collante era mediata da un meccanismo ossidativo indotto dalla liberazione di radicali ossidrilici.
Meccanismo analogo di indurimento e ispessimento delle fibre collagene è stato dimostrato nell'invecchiamento corneale dove è emerso un ruolo attivo della *glicosilazione* delle molecole del tropocollagene.

L'idea di questo approccio conservativo per la cura del cheratocono è nata in Germania alla metà degli anni '90 ad opera di un gruppo di ricercatori dell'Università tecnica di Dresda guidati da Gregor Wollensak, Theo Seiler ed Eberhard Spoerl con lo scopo di rallentare o bloccare la progressione del cheratocono evitando o ritardando il ricorso alla cheratoplastica.
La base di partenza è clinicamente e scientificamente supportata dal fatto che i giovani pazienti diabetici non risultano quasi mai affetti da cheratocono o nei rarissimi casi pre-esistenti all'esordio della malattia diabetica non dimostrano alcuna progressione grazie all'effetto *cross-linkante* naturale del glucosio il quale induce un

incremento della resistenza corneale in questi soggetti mediante glicosilazione delle molecole di collagene *(cross-linkig chimico)*.
Possiamo quindi rilevare l'esistenza di un cross-linking fisiologico età-dipendente, un *cross-linking* patologico dismetabolico (diabete mellito di tipo I) ed un *cross-linking* terapeutico fotobiologicamente indotto.

Le proprietà biomeccaniche della cornea dipendono fortemente dalle caratteristiche delle fibre collagene (15.000 km), dai legami inter-fibrillari e dalla loro disposizione spazio-strutturale. La resistenza biomeccanica della cornea nel cheratocono è ridotta del 50% rispetto alla cornea normale per la riduzione del numero dei legami inter-fibrillari.
La tecnica del *cross-linking* del collagene corneale viene impiegata ad oggi sperimentalmente in alcuni Centri di chirurgia oculare in Italia e all'Estero per bloccare, almeno *pro-tempore* (da 3 a 10 anni i tempi di rinnovo delle fibrille collagene), la progressione della cheratectasia correlata al cheratocono in fase refrattiva come una sorta di *"freezing"* o congelamento del collagene stromale con conseguente incremento della stabilità biomeccanica della cornea.

La metodica del *cross-linking* corneale mediante Riboflavina-UVA è tecnicamente semplice e meno invasiva di tutte le altre proposte terapeutiche sul cheratocono e l'unica con finalità *"patogenetica"*. Occorre infatti tener presente che la chirurgia del trapianto, lamellare e perforante, è complessa e non scevra da complicanze, anche gravi, che richiedono lunghi periodi riabilitativi.

Rispetto alle altre metodiche mini-invasive quali gli anelli intrastromali (INTACS), la chirurgia con laser ad eccimeri, le quali non sono in grado di bloccare la cheratectasia rivolgendosi esclusivamente alla cura degli effetti rifrattivi del cheratocono, il *CROSS-LINKING DEL COLLAGENE* si rivolge alla prevenzione ed alla cura di alcuni tra i più importanti meccanismi fisiopatologici alla base del cheratocono avendo dimostrato: un effetto di incremento sulla resistenza e sulla stabilità biomeccanica della cornea, un effetto di aumento del diametro fibrillare del collagene, un effetto anticollagenasico, un effetto apoptotico di bonifica dei cheratociti degenerati dello stroma anteriore ed intermedio seguito da un ripopolamento cellulare che parte dagli strati corneali profondi (cellularmente integri). Il processo di fotopolimerizzazione inizia con una *deaminazione ossidativa* e la formazione di legami fra filamenti di collagene adiacenti contenute all'interno della stessa fibrilla e la successiva azione di ripopolamento cellulare con cheratociti "sani" provenienti dalla porzione corneale posteriore e (solo parzialmente) periferica della cornea. Questo meccanismo ripopolativo è, ma ciò necessita tempo per essere verificato, alla base della durata nel tempo del fenomeno di cross-linking riferito dai colleghi di Dresda, ben superiore al tempo di rinnovamento del collagene corneale che si completa in 24-36 mesi. Questa durata nel tempo potrebbe essere la chiave di volta del trattamento: nuove cellule cheratocitarie "sane" condizionano la formazione di collagene non patologicamente privo di legami intrafibrillari (quindi normali) che nel lungo periodo rimpiazzano il collagene cross-linkato.

Indicazioni del Cross-linking

Il *cross-linking* del collagene mediante Riboflavina 0,125% - UVA è consigliabile nelle forme di cheratocono in fase refrattiva (stadio 1 e 2) che stanno progredendo negativamente, il cui peggioramento negli ultimi 6 mesi sia documentabile clinicamente, topograficamente, pachimetricamente *(thinnest point Orbscan II)*, topoaberrometricamente (peggioramento delle componenti *comatica* e di *alto ordine*).
Da escludere dal trattamento categoricamente tutti gli occhi con spessore corneale inferiore a 400 micron in *thinnest point*, a nostro avviso sono da escludere dal trattamento sperimentale anche soggetti in età inferiore ai 14 anni e superiore ai 40 anni, quei pazienti che manifestino stabilità clinico-strumentale acclarata negli ultimi 6-12 mesi, occhi con storia di pregressa cheratite erpetica, presenza di opacità cicatriziali corneali e *strie di Vogt* marcatamente evidenti alla lampada a fessura e verificate anche con microscopia confocale per la tipizzazione dell'orientamento. In questa situazione sono da escludere dal trattamento soggetti con strie di Vogt a distribuzione o pattern reticolare o intrecciate evidenti all'esame della cornea mediante microscopia confocale. Questa ultima rappresenta una controindicazione da noi evidenziata per la prima volta a livello mondiale con la pubblicazione sulle più prestigiose riviste specializzate del settore, per il potenziale sviluppo di *haze* corneale (opacità cicatriziale) post-operatorio; sono inoltre da escludere dal trattamento anche pazienti con grave occhio secco, infezioni corneali in atto e malattie autoimmuni concomitanti.

Casistica di Siena

Dal 2004, previa unanime approvazione del Comitato Etico della nostra Università, abbiamo trattato 34 occhi di 33 pazienti affetti da cheratocono in evoluzione documentata clinicamente e strumentalmente, di età compresa tra 14 e 39 anni. Un solo paziente è stato trattato in entrambe gli occhi a distanza di 12 mesi da primo occhio per manifesto peggioramento del cheratocono nell'occhio non trattato. Abbiamo ottenuto a 2 anni di *follow up* una riduzione media della curvatura corneale di 2 Diottrie, che fino ad oggi si è mantenuta stabile a partire dal sesto mese post trattamento. Il risultato più importante è stato quello della stabilizzazione della malattia in tutti i casi trattati ed un incremento della capacità visiva con occhiali intorno a due linee di *Snellen*, riferibile ad un incremento della simmetria e ad un miglioramento del profilo corneale.
Confrontando il miglioramento di circa 2 diottrie dell'occhio trattato con il peggioramento di 1,25 diottrie in media nell'occhio non trattato, appare evidente quanto l'effetto stabilizzante sia significativo dopo cross-linking.
Tra le complicanze abbiamo evidenziato in pochi casi (4 su 34) un haze (opacità corneale) transitorio che si è risolto dopo terapia locale con steroidi.
Abbiamo evidenziato attraverso gli studi di microscopia confocale *in vivo* (analisi a scansione laser del tessuto corneale) sia i parametri di sicurezza che i possibili fattori correlati con lo sviluppo di complicanze ottimizzando la terapia post-operatoria e i criteri di inclusione nel trattamento. Lo studio mediante microscopia confocale della rigenerazione nervosa corneale, dello stroma e dei cheratociti, ha consentito di valutare tali processi *"in vivo"* direttamente nell'uomo monitorando l'efficacia e la sicurezza di questo promettente trattamento per la prima volta al mondo.

L'esperienza acquisita a Siena con la metodica del cross-linking, sulla base degli studi sperimentali di Dresda e con i nostri risultati clinici, ci ha consentito di sviluppare una nuovo strumento per l'irradiazione ultravioletta (UVA) denominato CBM X LInker (Caporossi, Baiocchi, Mazzotta) costruito dalla ditta C.S.O. di Scandicci (Firenze), attualmente provvista di marchio CE. Tale strumento consente di superare i limiti tecnici dello strumento originario di Dresda e del primo prototipo italiano (Caporossi, Mazzotta), fondamentalmente legati alla omogeneità del fascio UVA e alla costanza di emissione su tutta l'area irradiata e per tutta la durata della irradiazione, nel rispetto dei parametri fisici di sicurezza dimostrati sperimentalmente. La nuova macchina consente inoltre notevoli miglioramenti da un punto di vista ergonomico (timer audio-visivo integrato, comando a pedale di accensione e spegnimento UVA, base a stativo, testata e braccio regolabili micro e macrometricamente) e funzionale (luce di fissazione per il paziente, *aiming beam* di focalizzazione, micro-telecamera integrata per il controllo in *real time* della centratura e della focalizzazione con la visione del campo operatorio per tutta la durata del trattamento su apposito schermo LCD integrato.

Scheda tecnica

1. **Descrizione riassuntiva della procedura**
2. **Indicazioni**
3. **Controindicazioni**
4. **Vantaggi**
5. **Rischi**
6. **Avvertenze e Precauzioni d'impiego**

1. Descrizione riassuntiva della procedura

Tecnica chirurgica degli Autori:
Apertura sterile in sala operatoria della soluzione di riboflavina 0,125% - destrano 20%
Verifica dell'energia dell'illuminatore UVA led array a stato solido CBM X linker mediante UVA power - meter.
step 1: pre-medicazione dell'occhio da trattare mediante istillazione di una goccia di pilocarpina 1% collirio 30 minuti prima dell'intervento
step 2: anestesia topica (lidocaina 4%) in collirio (4 istillazioni nei 15 minuti prima dell'inizio della procedura).
step 3: posizionamento del blefarostato e disepitelizzazione corneale di 9 mm di diametro con spatola o scarificatore epiteliale semitagliente.
step 4: istillazione di una goccia di lidocaina 4%
step 5: istillazione della soluzione di riboflavina fosfato 0,125%, 10-15 minuti prima dell'inizio dell'irradiazione (3-4 gocce) ogni 2-3 minuti
step 6: istillazione di 2-4 gocce di soluzione di riboflavina ed inizio della irradiazione corneale nei 9 mm centrali e controllo real time della procedura mediante il monitor LCD del CBM X linker.
step 7: istillazione della soluzione di riboflavina 0,125% ogni 2-3 minuti durante il trattamento e per 30 minuti complessivi.
step 8: lavaggio della superficie corneale con abbondante BSS, medicazione con ofloxacina coll, ciclopentolato coll, flurbiprofene coll, e bendaggio con lente a contatto terapeutica per 5 giorni.

2. Indicazioni *(estrapolate dallo studio Siena Eye Cross 2004)*

Criteri di inclusione per il cross-linking del collagene corneale riboflavina UVA
- pazienti di sesso maschile e femminile
- pazienti dai 14 ai 40 anni
- pazienti che hanno sottoscritto il modello di consenso informato specifico
- pazienti affetti da cheratocono progressivo clinicamente e strumentalmente documentato

- pazienti affetti da cheratocono e/o ectasia secondaria, clinicamente, topograficamente e pachimetricamente documentato
- pazienti con spessore corneale (thinnest point) ≥ 400 micron
- pazienti con cornea trasparente (assenza di cicatrici od opacità stromali)

3. Controindicazioni

Criteri di esclusione
I pazienti non potranno essere inclusi nel trattamento se sarà presente anche solamente uno solo dei criteri di esclusione di seguito riportati:
- pazienti con spessore corneale in thinnest point inferiore a 400 micron
- pazienti affetti da cheratite erpetica pregressa e/o infezioni oculari in atto
- pazienti affetti da grave occhio secco (riduzione del film lacrimale > 50%)

4. Vantaggi

- trattamento parachirurgico conservativo del cheratocono e delle patologie corneali ectasiche
- rallentamento della progressione del cheratocono
- prevenzione della necessità di trapianto corneale
- trattamento adiuvante in chirurgia corneale

5. Rischi dell'intervento (per tutte le strutture dell'occhio) allo stato attuale osservando rigorosamente le indicazioni e controindicazioni:

- nessun effetto collaterale per l'endotelio corneale allo stato attuale
- nessun effetto collaterale per la lente allo stato attuale
- nessun effetto collaterale per la retina allo stato attuale
- dolore post-operatorio e sensazione di corpo estraneo per 24-48 ore fino a riepitelizzazione completata
- iperlacrimia per 24-72 ore
- edema corneale transitorio con appannamento visivo per 30-60 giorni
- edema corneale persistente oltre il secondo mese
- haze corneale
- il trattamento non esclude la possibilità di cheratoplastica

6. Avvertenze e precauzioni d'impiego

La tecnica di cross-linking corneale per il cheratocono e le patologie ectasiche corneali non esclude la possibilità di trapianto corneale in un secondo tempo in generale o laddove si registrasse una ripresa clinico strumentale della malattia a distanza

dal trattamento. Il trattamento è tuttavia ripetibile anche se fino ad oggi non sono noti casi in cui un ulteriore cross-linking è stato necessario.
Si raccomanda il rispetto assoluto dei parametri fisico-chimici e dei tempi previsti per la procedure desumibili dalla letteratura internazionale sul tema onde evitare danni a livello dell'endotelio corneale, della lente e della retina attualmente non registrati con i parametri impiegati. L'applicazione al di fuori delle indicazioni cliniche e dei parametri fisico-chimici attuali è sconsigliata per la potenzialità di opacità corneale secondaria ed effetti avversi non noti.
La presenza di *strie di Vogt* marcatamente evidenti alla biomicroscopia (più tipiche in fase avanzata di malattia) o il riscontro all'esame della cornea mediante microscopia confocale di strie scure intrecciate rappresenta una controindicazione relativa all'applicazione della metodica per il rischio potenziale di *haze* (opacità corneale) secondo l'esperienza clinica degli Autori. La microscopia confocale pre e post operatoria, la topografia corneale e la pachimetria sono obbligatorie per l'inclusione nel trattamento. Sebbene l'*haze* corneale è risultato transitorio ed ha dimostrato una risposta positiva alla terapia mediante corticosteroidi (Desametazone) e FANS (diclofenac e flurbiprofene) topici, la potenziale necessità di trapianto corneale in tali casi non può essere del tutto eliminata.
I pazienti sono tenuti al rispetto delle norme igieniche per l'utilizzo delle lenti a contatto per il possibile rischio infettivo corneale, del protocollo terapeutico e dei controlli post-operatori. La mancata osservanza dei controlli postoperatori previsti al primo, terzo, sesto mese, ad uno e due anni e possibilmente per più anni dopo l'intervento rappresenta una delle cause di possibile insuccesso del cross-linking corneale.
I pazienti sono tenuti a segnalare qualsiasi reazione o effetto collaterale non noto al proprio oculista di fiducia o al proprio medico curante.

Principali riferimenti bibliografici

1. SPOERL E., HUHLE M., SEILER Th.: Induction of Cross-linking in corneal tissue. Exp.Eye Res., Vol.66; 97-103: Jan. 1998.

2. WOLLENSAK G., SPOERL E., SEILER Th.: Riboflavin/Ultraviolet-A induced collagen cross-linking for the treatment of Keratoconus. Am. J. Ophthalmol. Vol.135; 620-627: 2003

3. CAPOROSSI A., BAIOCCHI S., MAZZOTTA C., TRAVERSI C. CAPOROSSI T.: Parasurgical therapy of keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in Italian study. Journal of Cataract and refractive surgery, in press.

4. CAPOROSSI A., BAIOCCHI S., MAZZOTTA C., TRAVERSI C.: Terapia parachirurgica del cheratocono mediante cross-linking corneale riboflavina-UVA: risultati refrattivi preliminari in Italia. Viscochirurgia XX/3 Dicembre; 6-18.

5. MAZZOTTA C., BALESTRAZZI A., TRAVERSI C., BAIOCCHI S., TOMMASI C., CAPOROSSI A.: Treatment of progressive keratoconus by Riboflavin-UVA induced Cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by HRT II in vivo confocal microscopy in humans. Cornea, in press

6. MAZZOTTA C., TRAVERSI C., BAIOCCHI S., SERGIO P., CAPOROSSI T., CAPOROSSI A.: Conservative treatment of Keratoconus by Riboflavin-UVA induced Cross-Linking of corneal collagen: first qualitative investigation of corneal epithelium, disappearance and regeneration of the subepithelial nerve plexus by in vivo HRT II system confocal microscopy in humans. Eur. J. Ophthalmol., 2006 Jul-Aug; 16(4):530-535.

7. CAPOROSSI A.: CBM (Caporossi, Baiocchi, Mazzotta) cross linker C.S.O: la tecnologia italiana per il cross-linking corneale. La voce A.I.C.C.E.R. 4/06 pp 21-23