

Cross-linking da córnea: protocolo padrão

Corneal Crosslinking: The Standard Protocol

Marcony R. Santhiago¹

RESUMO

O objetivo desta revisão é de determinar as indicações e eficácia da cirurgia que promove novas ligações covalentes entre as fibras de colágeno da córnea, conhecida como Cross-Linking (CXL), assim como esclarecer seus objetivos. O ceratocone é uma doença ectásica da córnea, bilateral, assimétrica, que, principalmente, cursa com encurvamento e afinamentos progressivo, e se inicia em geral na segunda década de vida. O uso primário do CXL tem sido na interrupção da progressão do Ceratocone. Apesar do conhecido encurvamento no estroma da córnea ocorrer nesses pacientes, a fisiopatologia por trás do ceratocone ainda é desconhecida e parece ser multifatorial. Pela evidência literária disponível até o momento, o CXL da córnea está, portanto indicado nos pacientes com doença em progressão. Concluímos que existe evidência suficiente para afirmar que o CXL da córnea é eficaz na estabilização da doença ectásica da cornea.

Descritores: Córnea/fisiologia; Córnea/metabolismo; Cross-linking reagentes; Ceratocone/terapia; Riblflavina/administração & dosagem; Protocolos

ABSTRACT

The purpose of this review is to determine the indications and efficacy of the surgery that promotes new covalent bonds between the collagen fibers of the cornea, known as Cross-Linking (CXL), as well as to clarify its objectives. Keratoconus is a bilateral, asymmetric ectatic disease of the cornea that mainly courses with steepening and progressive thinning, and usually begins in the second decade of life. The primary use of CXL has been in discontinuing the progression of keratoconus. Although known corneal stromal remodeling occurs in these patients, the pathophysiology behind keratoconus is still unknown and appears to be multifactorial. By the literary evidence available to date, the CXL of the cornea is safely indicated in patients with progressing disease. We conclude that there is sufficient evidence to affirm that cornea CXL is effective in stabilizing corneal ectatic disease.

Keywords: Cornea/physiology; Cornea/metabolismo; Cross-linking reagents; Keratoconus/therapy; Riboflavin/administration & dosage; Protocols

¹Departamento de Oftalmologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

¹Departamento de Oftalmologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

Recebido para publicação em 25/11/2016 - Aceito para publicação em 18/01/2017

INTRODUÇÃO

Observações quanto a menor progressão do ceratocone em pacientes com diabetes e maior idade levou a ideia de que o *crosslinking* natural das fibras de colágeno da córnea, poderia resultar em fortalecimento e enrijecimento dos tecidos.⁽¹⁾ Isto levou ao desenvolvimento da reticulação ou *crosslinking* (CXL) da córnea, um processo no qual uma combinação de um fotoindutor, luz ultra violeta (UV), e uma reação fotoquímica leva a indução de radicais livres, que conduz a uma ligação química entre as fibras de colágeno.

Um estudo inicial em animais revelou um aumento de até 70% da rigidez da córnea,⁽²⁾ enquanto o primeiro estudo clínico por Wollensak et al, mostrou interromper a progressão e levar a aplanamento da topografia corneana em pacientes com ceratocone.⁽³⁾ Desde então, vários estudos prospectivos têm ecoado os mesmos resultados em pacientes com ceratocone⁽⁴⁻⁶⁾ e ectasia corneana após a cirurgia refrativa (daqui em diante denominado “ectasia”).⁽⁷⁾

O objetivo desta revisão é de determinar as indicações da cirurgia que promove novas ligações covalentes entre as fibras de colágeno da córnea, conhecida como Cross-Linking (CXL), assim como esclarecer seus objetivos.

Fotoindutor

A Riboflavina funciona como um fotoindutor ótimo na reação bioquímica do CXL. Mesmo com ampla gama de absorção é segura para a circulação sistêmica.⁽⁸⁾ É, no entanto, uma molécula relativamente grande e sua principal limitação é a penetração adequada no estroma da córnea através de um epitélio íntegro, o que é fundamental para a sua ação eficaz. A técnica padrão (ou tradicional) que será discutida nesta revisão inclui a remoção do epitélio. Várias técnicas de CXL com epitélio íntegro (denominadas “*epi on*”) têm sido estudadas para contornar esse problema, embora a eficácia destes protocolos seja controversa.

Luz Ultravioleta (UV)

A luz UV é o segundo componente importante no CXL. Parâmetros-chave incluem comprimento de onda, fluência e tempo de irradiação, que são específicos para a eficácia e a segurança do tratamento. A gama de pico de absorção de riboflavina para CXL varia entre 360-370nm, tal como determinado através de estudos iniciais.⁽⁹⁾ As variações na intensidade e duração em estudos pré-clínicos estabeleceram que a máxima rigidez envolveu o uso de 3mW/cm² de energia durante 30 minutos, o que correspondeu à uma dose total de energia (fluência) de 5.4J/cm², e permitiu a maior eficiência de endurecimento do tecido. Esta forma de utilização foi denominada de protocolo padrão ou *Standard* (ou protocolo Dresden). Variações deste protocolo, com maior fluência e menor tempo, foram denominados CXL acelerado, que serão discutidos em outro capítulo.

A reação fotoquímica que leva ao real processo de enrijecimento envolve a riboflavina absorvendo a energia UV e excitação da molécula, para criar espécies reativas de oxigênio. Esta reação induz ligações covalentes entre as próprias moléculas de colágeno da córnea e entre o colágeno e proteoglicanos,⁽¹⁰⁾ processo que conduz à maior rigidez biomecânica. O oxigênio desempenha um papel fundamental em toda esta reação química, embora mais estudos sejam necessários para entender completamente esta relação e de que for-

ma o tempo e a forma de exposição ao oxigênio podem influenciar no resultado do tratamento.

Aplicação e indicações do CXL

Ceratocone

O ceratocone é uma doença ectásica da córnea, bilateral, assimétrica, que, principalmente, cursa com encurvamento e afinamentos progressivos, e se inicia em geral na segunda década de vida.⁽¹¹⁾ O uso primário do CXL tem sido na interrupção da progressão do Ceratocone. Apesar do conhecido encurvamento no estroma da córnea ocorrer nesses pacientes, a fisiopatologia por trás do ceratocone ainda é desconhecida e parece ser multifatorial.

Pela evidência literária disponível até o momento, e discutida em pormenores mais adiante, o CXL da córnea está, portanto indicado nos pacientes com doença em progressão:

Tabela 1
Principais sinais de progressão

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> · Aumento de pelo menos 1 dioptria (D) nos parâmetros ceratometricos em 12 meses (m) · Aumento de pelo menos 0.75 D nos parâmetros ceratometricos em 6 m · Aumento da miopia de 0.75D em 12 m em refração sob cicloplegia · Perda de pelo menos duas linhas de visão, na melhor visão corrigida em 12 m |
|--|

Muito ainda tem se discutido sobre a forma como a paquimetria, ou mapa paquimétrico, pode ser utilizado como documentação de progressão, e conseqüente indicação de CXL.

Evidência científica da eficácia do tratamento

O primeiro estudo clínico incluiu pacientes com ceratocone progressivo que foram submetidos ao protocolo padrão (de Dresden), que consistia em aplicar Riboflavina sobre a córnea desepitelizada, previamente à exposição durante 30 minutos à uma fonte de radiação UV com uma intensidade luminosa de 3mW/cm².^(2,3) Os primeiros estudos controlados e randomizados confirmaram a eficácia na interrupção da progressão da doença de forma segura, incluindo ainda aplanamento, melhora na acuidade visual, afinamento transitório da córnea durante os seis primeiros meses e melhora dos parâmetros topográficos.^(8,12) Raiskup et al.⁽⁶⁾ publicou o estudo com o follow-up mais longo até a presente data, dez anos de acompanhamento de pacientes com ceratocone, confirmando estabilidade, melhora da acuidade visual e dos parâmetros topográficos a longo prazo. Estudos conduzidos por nosso grupo demonstraram que o CXL é também eficaz em pacientes com ceratocone mesmo em fases avançadas da doença.⁽¹³⁾

Em recente revisão sistemática com meta-análise em vias de publicação conduzido por Santhiago e colaboradores, consultando os bancos de dados do MEDLINE, CINAHL, Biblioteca Cochrane e EMBASE, e analisando apenas estudos comparativos, foi demonstrado que há evidência científica suficiente

para afirmar que o protocolo padrão de CXL, é eficaz na interrupção da progressão da doença. Foram encontrados quinze estudos comparativos entre olhos submetidos ao método padrão de CXL e olhos não submetidos a tratamento, porém em sete artigos na há dados suficientes para análise adequada.⁽¹⁴⁻²⁰⁾Nossa meta-análise incluiu, portanto, 396 olhos submetidos ao CXL, avaliados por período que variou de 12 a 36 meses, comparados a 338 olhos não tratados. Outros estudos, não comparativos, corroboram os achados de interrupção de progressão e aparente segurança do tratamento.^(3-7,12,21-27)

Considerando o seu início em geral na segunda década de vida e a natureza progressiva do ceratocone, pacientes pediátricos podem beneficiar-se através do tratamento com o CXL.⁽²⁸⁾Estudos recentes confirmam a eficácia do tratamento, assim como a significativa melhora dos padrões topográficos e acuidade visual.⁽²⁹⁻³⁰⁾Todavia, acompanhamento maior sugere que apesar da melhora inicial, pacientes pediátricos podem apresentar progressão a longo prazo.³¹ Estudos adicionais são ainda necessários e devem ter como foco o desenvolvimento de técnicas e um protocolo apropriado, não somente afim de obter resultados duradouros e eficazes, mas principalmente que sejam seguros para o grupo de pacientes em idade pediátrica. O aconselhamento adequado aos pais é fundamental para que compreendam a natureza progressiva da doença e a necessidade de intervenção.

Sugerimos que se indique o CXL em:

- Ceratocone em progressão documentada na população adulta;
- No diagnóstico de ectasia pós cirurgia refrativa
- No diagnóstico de ceratocone na população com menos de 18 anos.

Pacientes com acuidade visual de 20/25 ou melhor, em qualquer idade, podem optar apenas por acompanhamento da doença, pois o CXL também apresenta complicações e pode cursar com baixa visual. Especificamente em crianças, que ainda apresentam adequada visão, o objetivo e as potenciais complicações de um eventual tratamento cirúrgico deve ser discutido e esclarecido antes de determinar qualquer conduta.

Ectasia iatrogênica da córnea

Ectasia de cornea após cirurgia refrativa (Ectasia) ocorre devido a instabilidade biomecânica entre as fibras de colágeno resultando em afinamento da córnea e encurvamento similar ao Ceratocone²¹. É por definição uma alteração progressiva.⁽³²⁻³³⁾

Estudos iniciais demonstraram que o CXL é eficaz na interrupção da progressão da ectasia⁷, e, posteriormente, estudos prospectivos revelaram ainda aplanamento na topografia da córnea e melhora na acuidade visual um ano após o tratamento.³⁴ Os riscos específicos para CXL no tratamento da ectasia pós-LASIK incluem chance de haze, complicações no flap e crescimento epithelial na interface.

Avaliando a eficácia do Tratamento

A principal medida evolutiva para se identificar o resultado do CXL, ou seja, que se interrompeu a progressão, é a análise longitudinal da curvatura da córnea. Além dos parâmetros de ceratometria (K), como K máximo, K central, K mais curvo e até K mais plano, as outras variáveis que indicaram a progressão e subsequente indicação do tratamento devem também ser utili-

zadas para acompanhamento do resultado de estabilização, como acuidade visual e miopia.⁽¹²⁾

Clinicamente uma linha de demarcação estromal, que provavelmente é uma das indicações da profundidade do tratamento, pode ser detectada ao exame com lâmpada de fenda embora seja mais facilmente documentada através da tomografia de coerência óptica (OCT) de segmento anterior e/ou microscopia confocal.⁽³⁵⁾Esta linha de demarcação provavelmente representa a transição entre estroma modificado pelo CXL e o estroma não tratado, mas não confirma o limite, até mesmo a presença de uma reação biomecânica, e, definitivamente, não representa necessariamente as únicas alterações promovidas pelo CXL. A linha de demarcação parece não estar relacionada com a alteração na acuidade visual ou na ceratometria máxima.⁽³⁶⁾

Estudos de laboratório nos mostram dados objetivos que confirmam que o CXL é de fato eficaz, através da visualização, em microscopia eletrônica, do aumento do diâmetro das fibras de colágeno.⁽³⁷⁾Além de maior resistência à digestão enzimática, ocorre aumento da rigidez biomecânica indicado pelo aumento no módulo de Young⁽²⁾ identificados através de modalidades de imagem como a microscopia de força atômica⁽³⁸⁾ e a microscopia de segundo harmônico. A microscopia de geração de segundo harmônico oferece uma oportunidade de imagem das fibrilas de colágeno em um modo de alto contraste, gerando uma reconstrução tridimensional e detectando diferenças no padrão de lamelas entre córneas tratadas e não tratadas.⁽³⁹⁾

A córnea tem propriedades elásticas dinâmicas e por isso a topografia fornece apenas uma fração da informação necessária para determinar a progressão, regressão ou estabilidade da doença. O estudo da biomecânica da córnea fornece informações adicionais que podem levar a uma melhor determinação do que significa eficácia pós CXL

Acompanhamento e medidas refrativas

Após o CXL para doenças ectásicas da córnea, recomendamos o acompanhamento do paciente de 3 em 3 meses no 1º ano, e de 6 em 6 meses a partir do 2º ano. De um modo geral medidas com finalidade refrativa, como adaptação de lente de contato pós CXL, tem melhores resultados após o período mais intenso de remodelamento estromal que dura cerca de 12 meses. Esta tem sido a rotina adotada pelo autor desta revisão.

Parâmetros de segurança e potenciais complicações

Os padrões de segurança estão centrados na proteção de estruturas oculares, tais como o endotélio da córnea, cristalino e retina. Primeiramente, uma espessura da córnea acima de 400µm deve ser respeitada afim de proteger o endotélio da córnea.⁽⁴⁰⁾ Uma vez removido o epitélio, existe o risco de desidratação, causando afinamento significativo em alguns casos. Muitos pacientes que sofrem de ectasia da córnea, dentre elas o Ceratocone, já possuem um afinamento acentuado antes do tratamento.

Protocolos modificados utilizam Riboflavina hipo-osmolar, que promove retenção de líquido, levando a aumento da espessura em até aproximadamente 25% do valor original, e, em alguns casos, chegando-se até a espessura mínima recomendada. Sabe-se que em córneas com valores abaixo de 350 µm, é improvável que se chegue até 400 µm. Estudos mais recentes utilizaram a Riboflavina sem Dextran para permitir o aumento da espessura da córnea.⁽⁴¹⁾ Existe uma preocupação a respeito

da segurança e eficácia dessas córneas de espessuras “iatrogenicamente modificadas”, uma vez que a resposta ao CXL pode ser menor devido à concentração diminuídas fibras de colágeno em uma córnea artificialmente hidratada.

Outra possível explicação para um risco de menor eficácia se refere ao fato do enrijecimento da córnea após o CXL ocorrer principalmente nas 300µm anteriores, logo, uma córnea excessivamente hidratada pode ser demasiadamente profunda para um tratamento efetivo.⁽⁴²⁾

Outra preocupação quanto a segurança inclui as complicações devido ao próprio tratamento. A remoção do epitélio cria uma variedade de riscos: infiltrados, reepitelização tardia e ceratite infecciosa. Quando ocorrem os infiltrados são estéreis e responde ao tratamento com corticoide, provavelmente representando uma reação de anticorpos do próprio organismo à modificação do tecido corneano.⁽⁴³⁾

Embora venha sendo estudado, o haze na córnea após o CXL ainda não tem seu impacto sobre a visão estabelecido. O dano aos ceratócitos, também é uma preocupação mesmo nas abordagens que preservam o epitélio. No entanto, estudos têm sugerido um repovoamento que ocorre dentro de semanas ou meses após o tratamento. Outros estudos sugerem que a apoptose de ceratócitos pode servir como um indicador para o sucesso do CXL.⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾

Remodelamento e aplanamento pós CXL

O remodelamento e enrijecimento associados ao processo cicatricial pós CXL, pode levar a aplanamento, muitas vezes significativo, afinamento e até opacidade. Muitos estudos, inclusive alguns conduzidos por nosso grupo,^(46,47) já demonstraram que pode acontecer intenso aplanamento pós CXL, podemos ultrapassar 10D. A melhor forma de acompanhar este aplanamento é através de mapas diferenciais, comparativos.

Os principais motivos relacionados ao aplanamento intenso são provavelmente o aumento localizado do módulo elástico do tecido, profundidade efetiva do tratamento e a localização central do cone.^(47,48)

O aumento localizado do módulo elástico é explicado em parte por um ajuste viscoelástico gradual à alteração da distribuição do stress tecidual, imposto por um enrijecimento seletivo da córnea relativo a esclera adjacente. Teoricamente este enrijecimento associado ao CXL reduz a tensão central da córnea e a transfere para o limbo, possibilitando aplanamento e hipermetropização.

Como um processo fotoquímico, diferentes barreiras biológicas vão desempenhar um papel na profundidade efetiva do tratamento. Dentro deste contexto, respostas diferentes em relação as propriedades biomecânicas ou um maior ou menor aumento no módulo elástico é provavelmente explicada pela heterogeneidade da doença; que envolve a interação intrínseca entre as fibras de colágeno e matrix celular e suas orientações, específicos de cada paciente. Sendo assim, fibras de colágeno com maior espaçamento entre elas, e um entrelaçamento mais defeituoso permite o efeito fotoquímico CXL alcançar áreas mais profundas e provocar um aumento mais intenso na rigidez da córnea. É, provavelmente, por este motivo que casos mais avançados (topograficamente córneas mais curvas) tem mais chance de maior aplanamento.

A influência da localização central no maior aplanamento esta relacionada ao ancoramento à esclera em 360°, possibilitan-

do maior distribuição das foras tensionais e efeito na curvatura.

Protocolo de CXL com maior fluência (método acelerado)

De acordo com a lei da reciprocidade de Bunsen-Roscoe, o mesmo efeito fotoquímico poderia ser alcançado com a redução do tempo de iluminação e correspondente aumento da intensidade de irradiação. De forma que 3 minutos de irradiação à 30 mW/cm², 5 minutos de irradiação à 18 mW/cm² ou 10 minutos de irradiação à 9 mW/cm² deveriam prover o mesmo efeito obtido com 30 minutos de irradiação à 3 mW/cm². Uma vez que todas combinações de tempo e intensidade resultariam a mesma quantidade de energia 5,4 J/cm².

Há uma grande variação nos parâmetros utilizados nos diferentes estudos que utilizam o método acelerado. As intensidades luminosas descritas variam de 7 – 30 mW/cm² com tempo de irradiação entre 3 e 15 minutos e um tempo de exposição à Riboflavina pré-irradiação entre 5 e 30 minutos. Todavia, apesar de ainda não haver um protocolo padrão para a forma acelerada, os resultados são concordam em revelar interrupção da progressão, estabilidade nos valores ceratométricos e, em alguns casos, até mesmo aplanamento da córnea.⁽⁴⁹⁻⁵⁴⁾

Novas indicações do CXL

Além das indicações iniciais afim de estabilizar o processo da doença ectásica, recentemente novas indicações foram avaliadas, que incluem a combinação do CXL combinado ao excimer laser denominado CXL plus⁽⁵⁵⁾ e o PACK- CXL (denominada cromóforo fotoativados para ceratite) usando os princípios do CXL para tratar infecções da córnea.⁽⁵⁶⁾

CXL Plus

O termo CXL plus refere-se à combinação de CXL com excimer laser. A ceratectomia fotorrefrativa (PRK) guiada pela topografia permite remodelar a córnea, teoricamente tornando-a mais regular, sem abordar a natureza progressiva da doença. Estudos têm mostrado uma melhora na acuidade visual e estabilidade com PRK topografiado com CXL.⁽⁵⁷⁾

A eficácia e segurança deste tipo de tratamento sequenciais, a profundidade do tratamento máximo e o uso de mitomicina C ainda são assuntos em debate. Caso seja realmente seguro a longo prazo a associação de PRK Topografiado seguido do CXL pode ser promissor para a reabilitação visual e interrupção da progressão da doença.

Além de potenciais complicações documentadas como opacidade ou afinamento, ainda há muito a se aprender sobre como por exemplo deve ser a sequência adequada de combinação, antes o PRK guiado pela topografia e depois o CXL ou o contrário. Ou se devem ser feitos um imediatamente em sequência ou deve-se aguardar algum tempo, e depois realizar o 2º procedimento. Caso se realize 1º o PRK guiado e depois o CXL, poderíamos ter uma grande imprevisibilidade do tratamento pelo processo de remodelamento associado ao CXL que já foi discutido. Seria então melhor realizar o CXL, esperar o remodelamento em aproximadamente 12 meses e somente depois realizar a cirurgia guiada pela topografia. Devemos lembrar que neste caso excimer laser seria empregado sobre uma córnea teoricamente modificada, enrijecida, e a taxa de ablação seria diferente, pois ocorreria hipocorreção. Teríamos que compreender melhor as taxas de ablação do excimer laser após o CXL.

Além disso devemos compreender que quando se trata de

excimer laser em córneas com ceratocone, a opção que tem sido mais estudada e aceita, é o PRK guiado pela topografia. Isto porque diferente de outras modalidades de PRK convencional ou até mesmo guiado por frente de onda, o PRK guiado pela topografia realiza uma combinação de PRK miopico parcial no ápice do cone com um PRK hipermetropico na área adjacente. Desta forma há uma menor remoção de tecido da área mais fina e mais afetada pela doença. É importante lembrar ainda que a principal função deste tipo de tratamento guiado pela topografia não é correção refrativa e sim a regularização da córnea.

Tratamentos guiados por frente de onda parecem não ser menos adequados que os guiados por topografia, primeiro pela dificuldade de se obter exames de aberrometria confiáveis e reprodutíveis em córneas tão irregulares, segundo porque neste tratamento tipo de tratamento o software iria identificar a área mais aberrada (geralmente ápice do cone) e tentar regularizá-la ao máximo, podendo significar afinamento excessivo em uma área já doente.

Cromóforo fotoativado para ceratite - PACK-CXL

Em adição ao tratamento da ectasia, os princípios básicos do CXL já foram sugeridos como opção de tratamento para ceratite infecciosa denominado “photoactivated chromophore for keratitis” (PACK-CXL) ou cromóforo fotoativado usado para o tratamento da ceratite infecciosa. Teorias incluem a capacidade para danificar diretamente o microorganismo e aumentar a resistência a danos enzimáticos, impedir a replicação microbiana, liberar radicais livres, e alterar a superfície ocular com o propósito de criar um ambiente hostil para mais microrganismos.

Estudos *in vivo* em animais mostraram eficácia no tratamento de patógenos em ceratite desafiadoras, enquanto dados clínicos mostram melhoria na ceratite com o uso concomitante de anti-microbianos.⁽⁵⁷⁾ O único estudo prospectivo comparativo que avalia o uso da medicação sozinha versus a medicação associada ao PACK-CXL foi descrito por Said et al, e revelou que o tempo de cura era o mesmo com uma tendência de resolução mais rápida no grupo PACK-CXL.⁽⁵⁸⁾ Uma revisão sistemática e meta-análise de 12 séries de casos sugeriu um melhor tempo de cicatrização em casos relacionados a bactérias e pior prognóstico e maior risco de transplante em casos de fungo, acantameba e gram negativos.⁽⁵⁹⁾

Os protocolos acelerados parecem também ser capazes de tratar e eliminar agentes patogênicos, permitindo um tratamento mais breve e com resolução equivalente quanto a morte dos patógenos. Alguns relatos de caso sugerem que o PACK-CXL sozinho pode ajudar no tratamento da ceratite infecciosa, mas estudos maiores são necessários.

Estudo prospectivos randomizados comparando o tratamento com medicamento versus medicamento com PACK-CXL, versus PACK-CXL seriam o ideal, mas existem considerações éticas relevantes. Independentemente, o PACK-CXL oferece outra opção de tratamento para casos difíceis de ceratite microbiana.

Em conclusão, existe evidência suficiente para afirmar que o CXL da córnea é eficaz na estabilização da doença ectásica da córnea.

REFERÊNCIAS

1. Daxer A, Misof K, Grabner B, Ettl A, Fratzl P. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(3):644-8.
2. 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.
3. 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.
4. Randleman JB, Khandelwal SS, Hafezi F. Corneal cross-linking. *Surv Ophthalmol.* 2015;60(6):509-23.
5. Vinciguerra P, Albe E, Traza S, Rosetta P, Vinciguerra R, Seiler T, et al. Refractive, topographic, tomographic, and aberrometric analysis of keratoconic eyes undergoing corneal cross-linking. *Ophthalmology.* 2009;116(3):369-78.
6. Raiskup F, Theuring A, Pillunat LE, Spoerl E. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus: Ten-year results. *J Cataract Refract Surg.* 2015;41(1):41-6.
7. 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.
8. Edwards AM. Structure and general properties of flavins. *Methods Mol Biol.* 2014;1146:3-13.
9. 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.
10. Zhang Y, Conrad AH, Conrad GW. Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. *J Biol Chem.* 2011;286(15):13011-22.
11. Krachmer JH, Feder RS, Belin MW. Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol.* 1984;28(4):293-322.
12. Ghanem RC, Santhiago MR, 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.
13. Giacomini NT, Netto MV, Torricelli AA, Marino GK, Bechara SJ, Espíndola RF, et al. Corneal collagen cross-linking in advanced keratoconus: a 4-year follow-up study. *J Refract Surg.* 2016;32(7):459-65.
14. 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.
15. Coskunseven E, Jankov MR 2nd, Hafezi F. Contralateral eye study of corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA irradiation in patients with keratoconus. *J Refract Surg.* 2009;25(4):371-6.
16. Hersh PS, Greenstein SA, Fry KL. Corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: One-year results. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37(1):149-60.
17. Henriquez MA, Izquierdo L Jr, Bernilla C, Zakrzewski PA, Mannis M. Riboflavin/Ultraviolet A corneal collagen cross-linking for the treatment of keratoconus: visual outcomes and Scheimpflug analysis. *Cornea.* 2011;30(3):281-6.
18. Wittig-Silva C, Chan E, Islam FM, Wu T, Whiting M, Snibson GR. A randomized, controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: three-year results. *Ophthalmology.* 2014;121(4):812-21.
19. Viswanathan D, Males J. Prospective longitudinal study of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus. *Clin Exp Ophthalmol.* 2013;41(6):531-6.

20. Seyedian MA, Aliakbari S, MirafTAB M, Hashemi H, Asgari S, Khabazkhoob M. Corneal Collagen Cross-Linking in the Treatment of Progressive Keratoconus: A Randomized Controlled Contralateral Eye Study. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2015;22(3):340-5.
21. Greenstein SA, Fry KL, Hersh PS. In vivobiomechanical changes after corneal collagen cross-linking for keratoconus and corneal ectasia: 1-year analysis of a randomized, controlled, clinical trial. *Cornea.* 2012 ;31(1):21-5.
22. Greenstein SA, Fry KL, Hersh MJ, Hersh PS. Higher-order aberrations after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg.* 2012;38(2):292-302.
23. Greenstein SA, Fry KL, Hersh PS. Corneal topography indices after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: one-year results. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37(7):1282-90.
24. Khattak A, Nakhli FR, Cheema HR. Corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus in Saudi Arabia: One-year controlled clinical trial analysis. *Saudi J Ophthalmol.* 2015 Oct;29(4):249-54.
25. Lamy R, Netto CF, Reis RG, Procopio B, Porco TC, Stewart JM, et al. Effects of corneal cross-linking on contrast sensitivity, visual acuity, and corneal topography in patients with keratoconus. *Cornea.* 2013;32(5):591-6.
26. Lang SJ, Messmer EM, Geerling G, Mackert MJ, Brunner T, Dollak S, et al. Prospective, randomized, double-blind trial to investigate the efficacy and safety of corneal cross-linking to halt the progression of keratoconus. *BMC Ophthalmol.* 2015;15:78
27. O'Brart DP, Chan E, Samaras K, Patel P, Shah SP. A randomized, prospective study to investigate the efficacy of riboflavin/ultraviolet A (370nm) corneal collagen cross-linkage to halt the progression of keratoconus. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(11):1519-24.
28. Leoni-Mesplie S, Mortemousque B, Touboul D, Malet F, Praud D, Mesplie N, et al. Scalability and severity of keratoconus in children. *Am J Ophthalmol.* 2012;154(1):56-62.
29. Uçakhan ÖÖ, Bayraktutar BN, Saglik A. Pediatric corneal collagen cross-linking: long-term follow-up of visual, refractive, and topographic outcomes. *Cornea.* 2016;35(2):162-8.
30. McAnena L, Doyle F, O'Keefe M. Cross-linking in children with keratoconus: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol.* 2016 Sep 28. doi: 10.1111/aos.13224.
31. 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.
32. Randleman JB, Woodward M, Lynn MJ, Stulting RD. Risk assessment for ectasia after corneal refractive surgery. *Ophthalmology.* 2008;115(1):37-50.
33. Santhiago MR, Smadja D, Gomes BF, Mello GR, Monteiro ML, Wilson SE, et al. Association between the percent tissue altered and post-laser in situ keratomileusis ectasia in eyes with normal preoperative topography. *Am J Ophthalmol.* 2014;158(1):87-95.
34. Richo O, Mavranakas N, Pajic B, Hafezi F. Corneal collagen cross-linking for ectasia after LASIK and photorefractive keratectomy: long-term results. *Ophthalmology.* 2013;120(7):1354-9.
35. Kymionis GD, Grentzelos MA, Plaka AD, Tsoularas KI, Diakonis VF, Liakopoulos DA, et al. Correlation of the corneal collagen cross-linking demarcation line using confocal microscopy and anterior segment optical coherence tomography in keratoconic patients. *Am J Ophthalmol.* 2014;157(1):110-5 e1.
36. Bouheraoua N, Jouve L, El Sanharawi M, Sandali O, Temstet C, Loriaut P, et al. Optical coherence tomography and confocal microscopy following three different protocols of corneal collagen crosslinking in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(11):7601-9.
37. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea.* 2004;23(5):503-7.
38. Seifert J, Hammer CM, Rheinlaender J, Sel S, Scholz M, Paulsen F, et al. Distribution of Young's modulus in porcine corneas after riboflavin/UVA-induced collagen cross-linking as measured by atomic force microscopy. *Plos One.* 2014;9(1):e88186.
39. Tan HY, Chang YL, Lo W, Hsueh CM, Chen WL, Ghazaryan AA, et al. Characterizing the morphologic changes in collagen crosslinked-treated corneas by Fourier transform-second harmonic generation imaging. *J Cataract Refract Surg.* 2013;39(5):779-88.
40. Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, Kounis GA, Panagopoulou SI, Grentzelos MA. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A irradiation in patients with thin corneas. *Am J Ophthalmol.* 2012;153(1):24-8.
41. Hafezi F, Mrochen M, Iseli HP, Seiler T. Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(4):621-4.
42. Hafezi F. Limitation of collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution: failure in an extremely thin cornea. *Cornea.* 2011;30(8):917-9.
43. Ghanem RC, Netto MV, Ghanem VC, Santhiago MR, Wilson SE. Peripheral sterile corneal ring infiltrate after riboflavin-UVA collagen cross-linking in keratoconus. *Cornea.* 2012 ;31(6):702-5.
44. Greenstein SA, Fry KL, Bhatt J, Hersh PS. Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. *J Cataract Refract Surg.* 2010;36(12):2105-14.
45. Armstrong BK, Lin MP, Ford MR, Santhiago MR, Singh V, Grossman GH, et al. Biological and biomechanical responses to traditional epithelium-off and transepithelial riboflavin-UVA CXL techniques in rabbits. *J Refract Surg.* 2013;29(5):332-41.
46. Hafezi F, Koller T, Vinciguerra P, Seiler T. Marked remodeling of the anterior corneal surface following collagen cross-linking with riboflavin and UVA. *Br J Ophthalmol.* 2011;95:1171-2.
47. Santhiago MR, Giacomini NT, Medeiros CS, Smadja D, Bechara SJ. Intense early flattening after corneal collagen cross-linking. *J Refract Surg.* 2015;31(6):419-22.
48. Roy AS, Dupps WJ Jr. Patient-specific computational modeling of keratoconus progression and differential responses to collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):9174-87.
49. Ozgurhan EB, Akcay BI, Kurt T, Yildirim Y, Demirok A. Accelerated corneal collagen cross-linking in thin keratoconic corneas. *J Refract Surg.* 2015;31(6):386-390.
50. Shetty R, Pahuja NK, Nuijts RM, Ajani A, Jayadev C, Sharma C, et al. Current protocols of corneal collagen cross-linking: visual, refractive, and tomographic outcomes. *Am J Ophthalmol.* 2015;160(2):243-9.
51. Kymionis GD, Grentzelos MA, Kankariya VP, Liakopoulos DA, Portaliou DM, Tsoularas KI, et al. Safety of high-intensity corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2014;40(8):1337-40.
52. Seiler T, Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. *Cornea.* 2006 ;25(9):1057-9.

53. Touboul D, Efron N, Smadja D, Praud D, Malet F, Colin J. Corneal confocal microscopy following conventional, transepithelial, and accelerated corneal collagen cross-linking procedures for keratoconus. *J Refract Surg.* 2012; 28(11):769-76.
54. Kymionis GD, Tsoulnaras KI, Grentzelos MA, Plaka AD, Mikropoulos DG, Liakopoulos DA, et al. Corneal stroma demarcation line after standard and high-intensity collagen crosslinking determined with anterior segment optical coherence tomography. *J Cataract Refract Surg.* 2014; 40(5):736-40.
55. Kymionis GD, Grentzelos MA, Portaliou DM, Kankariya VP, Randleman JB. Corneal collagen cross-linking (CXL) combined with refractive procedures for the treatment of corneal ectatic disorders: CXL plus. *J Refract Surg.* 2014;30(8):566-76.
56. Hafezi F, Randleman JB. PACK-CXL: defining CXL for infectious keratitis. *J Refract Surg.* 2014;30(7):438-9.
57. Martins SA, Combs JC, Noguera G, Camacho W, Wittmann P, Walther R, et al. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest ophthalmolVisSci.* 2008;49(8):3402-8.
58. Said DG, Elalfy MS, Gatziofias Z, El-Zakzouk ES, Hassan MA, Saif MY, et al. Collagen cross-linking with photoactivated riboflavin (PACK-CXL) for the treatment of advanced infectious keratitis with corneal melting. *Ophthalmology.* 2014;121(7):1377-82.
59. Alio JL, Abbouda A, Valle DD, Del Castillo JM, Fernandez JA. Corneal cross linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported cases. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2013;3(1):47.

