

Tratamiento de queratitis micótica por *Fusarium* con *crosslinking* corneal

Gustavo Galperin^{a, c}, Martín Berra^{a, c}, Julia Tau^a, Gabriela Boscaro^b, Jorge Zarate^a y Alejandro Berra^a

^aLaboratorio de Investigaciones Oculares, Buenos Aires.

^bBioFundus, Buenos Aires.

^cHospital Pedro Lagleyze, Buenos Aires.

Resumen

Objetivo: Evaluar la eficacia de *crosslinking* corneal (riboflavina/luz ultravioleta A) como una modalidad terapéutica en la queratitis por hongos del género *Fusarium*.

Métodos: Veinticuatro conejos fueron anestesiados sistémicamente y luego inoculados en el estroma de la córnea derecha con una suspensión de *Fusarium solani* (105 unidades formadoras de colonias [UFC]/ml). Los conejos se dividieron en dos grupos: uno fue tratado con *crosslinking* corneal (CXL) 72 horas después de la infección y el otro no recibió ningún tratamiento (control). Todos los ojos de ambos grupos fueron examinados antes del CXL (días 0 y 3) y después del mismo (día 7). Los ojos fueron enucleados y los botones corneales fueron enviados para su análisis microbiológico y anatómico-patológico.

Resultados: Todos los animales desarrollaron queratitis por *Fusarium*, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos antes del tratamiento (día 0, $p = 0,397$ y el día 3, $p = 0,702$). Después del tratamiento con CXL, la diferencia en los resultados clínicos en el día 7 entre los grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$), el grupo CXL mostró el puntaje clínico más bajo. El grupo CXL presentó $22,45 \pm 5,09$ UFC/g y el grupo control $42,5 \pm 3,12$ UFC/g, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,01$). En los tres botones del grupo control se observó una cantidad similar de hifas de *Fusarium* y células inflamatorias. En dos de los tres botones de análisis del grupo CXL se observaron menor cantidad de hifas de *Fusarium* y células inflamatorias en comparación con el grupo control.

Conclusiones: El tratamiento de la queratitis por hongos con CXL parece ser eficaz en la disminución de la intensidad y la severidad de la queratitis infecciosa por *F. solani*. Por lo que concluimos que el CXL puede ser útil como tratamiento coadyuvante al tratamiento médico en infecciones resistentes.

Palabras clave: córnea, *crosslinking*, *Fusarium solani*, queratitis, riboflavina.

Treatment of fungal keratitis from *Fusarium* infection by corneal cross-linking

Abstract

Purpose: To evaluate the efficacy of corneal cross-linking (CXL) (riboflavin-UV-A) as a simple therapy in *Fusarium* keratitis.

Methods: Twenty-four rabbits were systemically anesthetized, and the stromata of their right corneas were inoculated with *Fusarium solani* [105 colony-forming units (CFU) per milliliter]. Rabbits were divided into 2 groups: one was treated with CXL 72 hours after infection and the other did not receive any treatment (control). All eyes in both the groups were examined before (days 0 and 3) and after (day 7) CXL treatment. The eyes were enucleated, and corneal buttons were sent for microbiological and histological examinations.

Results: All animals developed *Fusarium* keratitis; there was no statistically significant difference between groups before treatment (day 0, $P = 0.397$ and day 3, $P = 0.702$). After CXL treatment, the difference in clinical scores on day 7 between groups was statistically significant ($P = 0.001$); the CXL group showed significant lower clinical score. The CXL group had 22.45 ± 5.09 CFU/g compared with 42.5 ± 3.12 CFU/g in the control group; this difference was statistically significant

($P = 0.01$). In the 3 buttons of the control group, similar amounts of *Fusarium* hyphae and inflammatory cells were observed. In 2 of the 3 buttons analyzed from the CXL group, fewer *Fusarium* hyphae, inflammatory cells, and nonspecific stromal changes were observed compared with the control group.

Conclusions: Treatment of fungal keratitis with CXL seems to be effective in decreasing the intensity and severity of infectious keratitis by *F. solani*. This therapy may be useful as a coadjuvant in the medical treatment of resistant infections.

Keywords: cornea, cross-linking, *Fusarium solani*, keratitis, riboflavin-UV-A.

Tratamiento de ceratite micótica por *Fusarium* con *crosslinking* corneano

Resumo

Objetivo: Avaliar a eficácia do *crosslinking* corneano (riboflavina/luz ultravioleta A) como uma modalidade terapêutica na ceratite por fungos do género *Fusarium*.

Métodos: Vinte e quatro coelhos foram anestesiados sistematicamente e depois inoculados no estroma da córnea direita com uma suspensão de *Fusarium solani* (105 unidades formadoras de colônias [UFC]/ml). Os coelhos dividiram-se em dois grupos: um foi tratado com *crosslinking* corneano (CXL) 72 horas depois da infecção e o outro não recebeu nenhum tratamento (controle). Todos os olhos de ambos os grupos foram examinados antes do CXL (dias 0 e 3) e depois do mesmo (dia 7). Os olhos foram enucleados e os botões corneais foram enviados para uma análise microbiológica e anatomopatológica.

Resultados: Todos os animais desenvolveram ceratite por *Fusarium*, não houve diferencias estadísticas significativas entre os grupos antes do tratamento (dia 0, $p = 0,397$ e o dia 3, $p = 0,702$). Depois do tratamento com CXL, a diferença nos resultados clínicos no dia 7 entre os grupos foi estadisticamente significativa ($p < 0,001$), o grupo CXL mostrou a PONTAGEM clínico menor. O grupo CXL apresentou $22,45 \pm 5,09$ UFC/g e o grupo controle $42,5 \pm 3,12$ UFC/g, essa diferencia foi estadisticamente significativa ($p = 0,01$). Nos três botões do grupo controle observou-se uma quantidade similar de hifas de *Fusarium* e células inflamatorias. Em dois dos três botões de análise do grupo CXL observaram-se menor quantidade de hifas de *Fusarium* e células inflamatorias em comparação com o grupo controle.

Conclusões: O tratamento da ceratite por fungos com CXL parece ser eficaz na diminuição da intensidade e a severidade da ceratite infecciosa por *F. solani*. Pelo que concluimos que o CXL pode ser útil como tratamento coadjuvante ao tratamento médico em infecciones resistentes.

Palavras chave: córnea, *crosslinking*, *Fusarium solani*, ceratite, riboflavina.

Autor responsable: Martín Berra
Uniburu 950, entrepiso,
1114 Buenos Aires
martinberra81@hotmail.com

Oftalmol Clin Exp (ISSN 1851-2658) 2012; 5(3): 102-107.

Introducción

Las infecciones corneales tienen un profundo impacto en la calidad visual de la población, siendo hoy en día una importante causa de ceguera que requiere de un tratamiento quimioterápico o quirúrgico adecuado para preservar la visión¹.

En la actualidad existe una importante variedad de antimicrobianos que nos permiten tratar adecuadamente los diferentes tipos de infecciones corneales; sin embargo, debido a la creciente resistencia que desarrollan los gérmenes²⁻⁵ —siendo el caso más reciente el de las fluoroquinolonas⁶⁻⁹—, las infecciones pueden seguir progresando y requerir de tratamientos más agresivos para intentar su curación.

Las queratitis micóticas representan una de las formas más graves de infecciones corneales por su difícil diagnóstico y porque los antimicóticos no son tan efectivos como los antibióticos. Presentan escasa penetración corneal, se suelen utilizar en infecciones ya avanzadas y resulta más dificultoso obtener las preparaciones tópicas^{1,8}.

En los últimos años ha habido un incremento notable de reportes de infecciones por hongos²⁻³ posiblemente debido a la alteración de la flora bacteriana producto de la sobreutilización de antibióticos tópicos, la extensa utilización de corticoides y la mejora de los métodos de diagnóstico. Técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa y la microscopía

confocal han sido de gran ayuda en la identificación y el posterior tratamiento de diferentes infecciones micóticas.

Los hongos acceden a la córnea a través de un defecto epitelial que generalmente se debe a traumatismos con vegetales⁴, lentes de contacto^{2,5} o a enfermedades graves de la superficie ocular, y una vez en el estroma producen necrosis e inflamación. Pueden penetrar la membrana de Descemet intacta y de esta manera llegar a la cámara anterior.

La incidencia de las infecciones por hongos varía según la región y es más común en regiones con climas cálidos y húmedos. La flora normal de la superficie ocular incluye muchas especies de hongos⁶⁻⁷.

Las infecciones corneales producidas por *Fusarium solani* representan un tipo grave de la infección debido a la virulencia del hongo y su resistencia a medicamentos antifúngicos⁸. Puede causar complicaciones graves como descemetocelce, perforación, endoftalmiitis y pérdida visual irreversible⁹.

El efecto de los rayos ultravioleta (UV) en los microorganismos fue demostrado en numerosos artículos¹⁰⁻¹¹ y los rayos UV se utilizan comúnmente en las salas de operaciones para mejorar las condiciones de esterilidad. En 1960 se descubrió que la riboflavina expuesta a los rayos UV puede inactivar el ARN de algunos virus¹² y estudios recientes han demostrado que la riboflavina actúa como un fotomediador al inactivar patógenos en plasma, plaquetas y glóbulos rojos¹³⁻¹⁴. Además, se ha demostrado que el tratamiento combinado UV-A y riboflavina aumenta la resistencia de la córnea contra la digestión enzimática de los microorganismos¹⁵.

Materiales y métodos

Aislamiento de *Fusarium solani*

La cepa de *Fusarium solani* fue aislada de un paciente con queratitis micótica. El aislamiento fue cultivado en placas de agar papa dextrosa a 28°C. La preparación del inóculo se realizó por lavado la superficie del cultivo con Tween 80 al 0,1% en solución fisiológica estéril; luego se filtró la suspensión a través de dos capas de gasa estéril para retirar fragmentos de hifas. La suspensión de esporas fue transferida a un tubo estéril y centrifugado a 10.000 g. El sobrenadante se removió cuidadosamente con una pipeta estéril y las conidias (pellet) fueron resuspendidas en solución fisiológica estéril para producir el inóculo final de 8.6×10^4 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

Animales

El estudio incluyó a 24 conejos blancos New Zealand de peso 2,5-3 kg. Todos los conejos se trataron de acuerdo con las normas de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología para el uso de animales en investigación oftalmológica y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Los conejos fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina intramuscular 50 mg/kg y xilacina 5 mg/kg antes de todas las intervenciones. Para anestesiarse las córneas se aplicó tópicamente clorhidrato de proparacaína 0,5%. Se indujo queratitis por *Fusarium* en los ojos derechos mediante la inyección de 0,1 ml de una suspensión de *F. solani* ($8,6 \times 10^3$ UFC/0,1 ml) intraestromal en el centro de la córnea (fig. 1). Se dividieron aleatoriamente los conejos en dos grupos: el grupo tratado con *crosslinking* (UV-A/riboflavina) (CXL) y el grupo control.

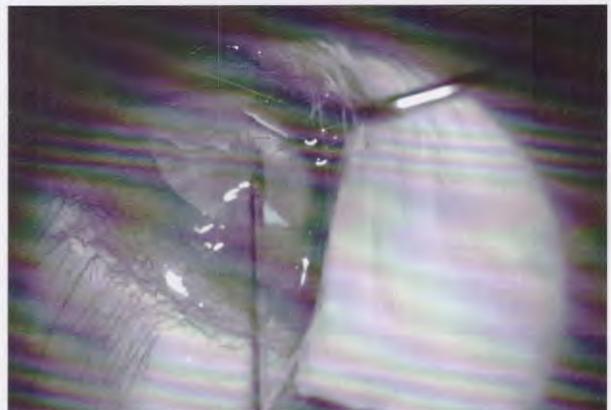


Figura 1. La suspensión de *F. solani* se inyectó intraestromal en el centro de la córnea derecha de todos los conejos.

Tratamiento

El tratamiento se realizó tres días luego de la infección (día 3). Los conejos fueron anestesiados intramuscularmente con una solución de hidrocloreto de ketamina 50 mg/kg y xilazina 5mg/kg. Las córneas derechas de los conejos del grupo CXL fueron anestesiadas tópicamente con hidrocloreto de proparacaína 0,5%. Un área de 7mm del epitelio corneal central fue desepitelizada manualmente. Como fotosensibilizador se aplicó una solución de riboflavina 0,1% (5-fosfato-riboflavina en 10 ml de dextran T-500 20%) cada 5 minutos durante 30 minutos previo a la irradiación y cada 5 minutos durante la irradiación. Después de permitir que la riboflavina penetrara la córnea se comenzó con la irradiación UV-A. Se utilizó el UV-X (IROC, Zurich, Suiza), que es un iluminador-UVA

controlado por temporizador. La irradiación deseada de 3 mW/cm² se controló con un contador de UV (Laser Mate-Q; LASER 2000, Wessling, Alemania) *ad hoc*. Las córneas derechas de los conejos se irradiaron con rayos UV (370 nm) a 1 cm de distancia durante 30 minutos con una intensidad de 3 mW/cm², lo que corresponde a una dosis de 5.4 J/cm².

Examen clínico

Se examinaron los ojos en el día 0, inoculación de los hongos, en el día 3, antes de realizar el tratamiento con CXL y en el día 7 (cuatro días después del tratamiento con CXL) con una lámpara de hendidura portátil para poder realizarle biomicroscopía. La extensión de la queratitis fue evaluada por un observador independiente a doble ciego. Se evaluó opacidad corneal, diámetro de la infiltración de la córnea y nivel de hipopión con el sistema de puntuación de Ozturk *et al.*¹⁶. Escala de edema corneal: 0 = córnea transparente, 1 = edema menor, 2 = edema corneal que ocupa dos cuadrantes de la córnea, y 3 = edema corneal total. El nivel de hipopión y el diámetro del infiltrado corneal se midieron en milímetros. El puntaje clínico para cada ojo se obtuvo de sumar los valores obtenidos del edema corneal, diámetro del infiltrado y nivel de hipopión.

Análisis microbiológicos y patológicos

El día 7 se extrajeron los botones esclerocorneales después de la eutanasia y nueve botones de cada grupo se enviaron a microbiología. La ruptura de las córneas se llevó a cabo en un mortero estéril y los botones se pesaron, se cultivaron en placas de agar con medio Sabouraud y se incubaron a 28°C durante 7 días. La cantidad de colonias se determinó en todos los cultivos. Otros tres botones de cada grupo fueron enviados para estudio histopatológico que se realizó con hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff y giemsa.

Análisis estadístico

La cantidad de colonias de *F. solani* obtenidas para cada botón se expresan en UFC/gr. Los resultados clínicos a los 0, 3 y 7 días fueron la suma de opacidad de la córnea, el diámetro de la córnea y el nivel de hipopión, de las puntuaciones obtenidas de cada conejo. Se realizó la prueba de Mann-Whitney para comparar las medias entre el grupo control y el grupo CXL en los diferentes días. El test de Wilcoxon (para dos muestras relacionadas) se utilizó para comparar la media de cada grupo entre los días 0 y 7. Ambas prue-

bas se realizaron con un nivel de significación de 0,05. Se utilizó el programa estadístico SPSS 17.0 (©2007 Sun Microsystems, Inc., Santa Clara, California, Estados Unidos).

Resultados

La queratitis por *Fusarium solani* se desarrolló en todos los ojos 72 horas después de la inoculación intraestromal. Los valores obtenidos del análisis de microbiología en el día 7 se presentan en la figura 2. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p = 0,01$), lo que indica que la proliferación de *Fusarium solani* fue significativamente inferior en el grupo CXL. La evaluación patológica se detalla en la tabla 1. Las células inflamatorias en este proceso son: linfocitos, células plasmáticas y algunos neutrófilos, eosinófilos y mastocitos. En dos de los tres botones del grupo CXL se observaron menor cantidad de hifas de *Fusarium*, células inflamatorias y alteraciones inespecíficas del estroma en comparación con el grupo control (fig. 3).

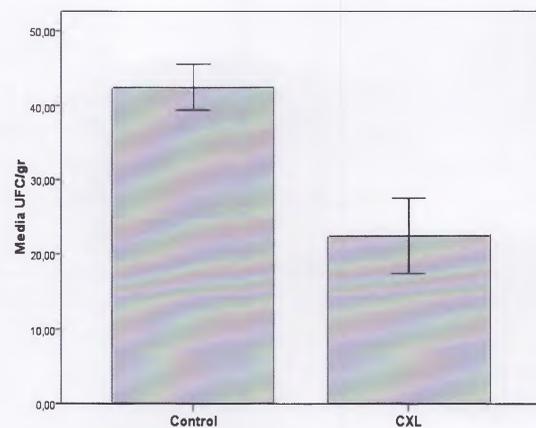


Figura 2. Unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) obtenidas en los cultivos de cada grupo. Las barras representan el error estándar de la media (ES). Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p = 0,01$, Mann-Whitney).

Los resultados clínicos obtenidos para cada grupo se presentan en la tabla 2. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos antes del tratamiento (día 0, $p = 0,397$ y el día 3, $p = 0,702$ (fig. 4a y c). Después del tratamiento con CXL, la diferencia en los resultados clínicos en el día 7 fue estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0,001$) (fig. 4b y d). Al analizar la progresión de la infección en cada grupo se vio que las diferencias de

Control	CXL
Se observaron cantidades similares de hifas de <i>Fusarium</i> y de células inflamatorias en los tres botones.	Menos hifas de <i>Fusarium</i> y menos células inflamatorias se observaron al comparar con el grupo control.
	Se observaron alteraciones inespecíficas del estroma y leucocitos aislados en el estroma. Menos hifas de <i>Fusarium</i> se observaron al comparar con el grupo control.
	Se observaron cantidades similares de hifas de <i>Fusarium</i> y células inflamatorias que en el grupo control.

Tabla 1. Descripción patológica obtenida del análisis de cada botón esclerocorneal.

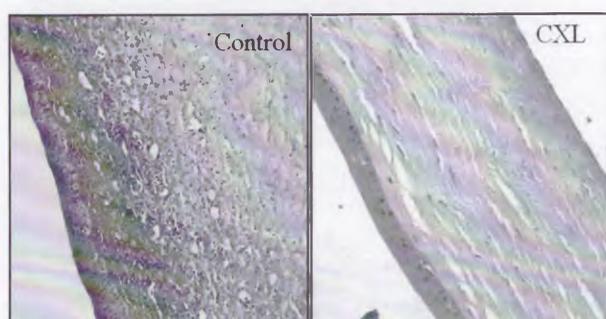


Figura 3. Ilustración de la histopatología de las córneas en el día 7.

los resultados clínicos obtenidos en los grupos entre los días 3 y 7 fue estadísticamente significativa para el grupo control ($p = 0,002$), pero no lo fue para el grupo CXL ($p = 0,223$). Estos resultados indican que los conejos del grupo control desarrollaron infección, como se esperaba, mientras que los del grupo CXL desarrollaron la infección pero de menor intensidad.

Discusión

La queratitis micótica es reconocida como una causa importante de morbilidad ocular. En la actualidad, el tratamiento de enfermedades por hongos en los ojos no es satisfactoria.

Los agentes antifúngicos disponibles en el mercado son en su mayoría fungistáticos porque requieren de un tratamiento prolongado. Por lo tanto, los métodos actuales de tratamiento con frecuencia no logran preservar o restaurar la visión después de una queratitis micótica.

Alexandrakis informó que el 70% de las queratitis por *Fusarium* superficial responden al tratamiento médico, pero el 70% de las lesiones más profundas no responden a los agentes actualmente de uso tópico¹⁷. En la actualidad, los agentes más comúnmente empleados de uso tópico para la queratitis por *Fusarium*

son la natamicina 5%, la anfotericina B 0,15% y los derivados azólicos.

Muchos estudios han demostrado que el *crosslinking* corneal no provoca efectos secundarios graves. En un estudio piloto, Wollensak *et al.* informó que la transparencia de la córnea y la del cristalino, la densidad de las células endoteliales y la presión intraocular se mantienen sin cambios después del tratamiento con CXL en pacientes con queratocono¹⁸. De hecho, no se encontró ningún efecto secundario grave en el grupo CXL en este estudio.

Se evaluó la eficacia del CXL tanto clínica como microbiológica. Tradicionalmente, la irradiación UV se utiliza para esterilización. Estudios *in vitro* demostraron un efecto antimicrobiano de amplio espectro de la riboflavina/combinada con rayos UV¹⁹. El tratamiento de la queratitis micótica con *crosslinking* corneal (riboflavina y UV-A) parece ser efectivo en la disminución de la intensidad y la gravedad de las infecciones, pero este tratamiento no produce una remisión completa de la queratitis infecciosa por hongos.

En conclusión, la terapia de *crosslinking* corneal puede ser considerada útil como tratamiento coadyuvante al tratamiento médico en infecciones micóticas resistentes.

Referencias

1. Srinivasan M. Fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15: 321-7.
2. Alfonso E, Mandelbaum S, Fox MJ, Forster RK. Ulcerative keratitis associated with contact lens wear. *Am J Ophthalmol* 1986; 101: 429-33.
3. Liesegang TJ, Forster RK. Spectrum of microbial keratitis in South Florida. *Am J Ophthalmol* 1980; 90: 38-47.
4. Clinch TE, Robinson MJ, Barron BA, Insler MS, Liang K, Kaufman HE. Fungal keratitis from

	Día 0	Día 3	Día 7	p-valor dentro de los grupos (día 3 vs. día 7)	p-valor entre los grupos (día 7)
Control	0,75 ± 0,13	2,48 ± 0,19	4,99 ± 0,49	0,002	< 0,001
CXL	0,58 ± 0,15	2,56 ± 0,18	2 ± 0,43	0,223	

Tabla 2. Puntaje clínico (media ± ES). Se empleó el test Wilcoxon para el análisis dentro de los grupos y el de Mann Whitney para el análisis entre los grupos.

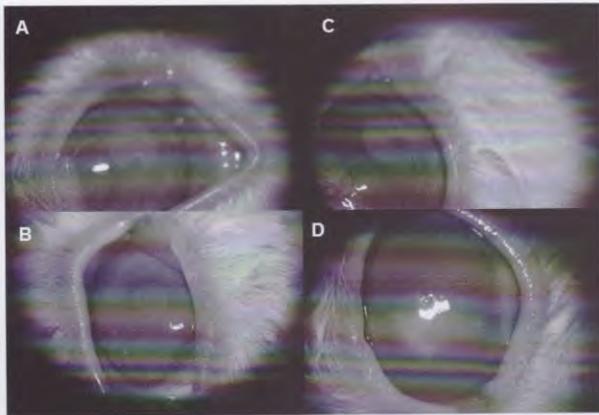


Figura 4. Los ojos del grupo con crosslinking (CXL) en el día 3 (a) y el día 7 (b). Los ojos del grupo control el día 3 (c) y el día 7 (d).

nylon line lawn trimmers. *Am J Ophthalmol* 1992; 114: 437-40.

5. Kremer I, Goldenfeld M, Shmueli D. Fungal keratitis associated with contact lens wear after penetrating keratoplasty. *Ann Ophthalmol* 1991; 23: 342-5.

6. Ainley R, Smith B. Fungal flora of the conjunctival sac in healthy and diseased eyes. *Br J Ophthalmol* 1965; 49: 505-15.

7. Ando N, Takatori K. Fungal flora of the conjunctival sac. *Am J Ophthalmol* 1982; 94: 67-74.

8. Reuben A, Anaissie E, Nelson PE *et al.* Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of *Fusarium* species determined by using a broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1647-9.

9. Doczi I, Gyertvai T, Kredics L, Nagy E. Involvement of *Fusarium spp.* in fungal keratitis. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 773-6.

10. Rau H. [A transportable apparatus for UV irradiation in final disinfection of patient rooms.]. *Das Deutsche Gesundheitswesen* 1960; 15: 148-51.

11. Muller G, Goethe H, Herrmann R. Bakteriologische Untersuchungen zur Trinkwasserdesinfektion durch UV-Bestrahlung an Bord von Seeschiffen [Ship drinking water disinfection using UV irradiation. II]. *Zentralbl Bakteriol Orig B* 1972; 156: 361-72.

12. Tsugita A, Okada Y, Uehara K. Photosensitized inactivation of ribonucleic acids in the presence of riboflavin. *Biochim Biophys Acta* 1965; 103: 360-3.

13. Asano H, Lee CY, Fox-Talbot K, *et al.* Treatment with riboflavin and ultraviolet light prevents alloimmunization to platelet transfusions and cardiac transplants. *Transplantation* 2007; 84: 1174-82.

14. Goodrich RP. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang* 2000; 78 Suppl 2: 211-5.

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

16. Ozturk F, Yavas GF, Kusbeci T *et al.* Efficacy of topical caspofungin in experimental *Fusarium* keratitis. *Cornea* 2007; 26: 726-8.

17. Alexandrakis G, Jalali S, Gloor P. Diagnosis of *Fusarium* keratitis in an animal model using the polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 306-11.

18. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135: 620e7.

19. Martins SA, Combs JC, Noguera G *et al.* Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365nm) in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 3402-8.